

Einfluss spinaler Mechanismen auf die Regulation einer peripheren Entzündung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Konstanze Weber

geboren am 06. Oktober 1982 in Köthen

Erster Gutachter

Zweiter Gutachter

Dritter Gutachter

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AD	Außendurchmesser
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AK	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Aktivator Protein 1
AVP	Arginin Vasopressin
CFA	komplette Freund's Adjuvans
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HWK	Halswirbelkörper
IASP	International Association for the Study of Pain
i.a.	intraartikulär
I.E.	Internationale Einheit
ID	Innendurchmesser
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathekal
i.v.	intravenous
K/C-Arthritis	Kaolin/Carrageenan-induzierte Arthritis
KG	Körpergewicht
L1-L4	lumbales Segment 1-4
LR	links-rechts Abstand zwischen den Pfotenabdrücken
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	MAP-Kinase
mBSA	methyliertes Rinderserumalbumin (methylated bovine serum albumin)

mRNA	messenger ribonucleic acid (RNS: Ribonukleinsäure)
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NGF	nerve growth factor
NKA	Neurokinin A
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
PBS-Puffer	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PNS	Peripheres Nervensystem
RA	Rheumatoide Arthritis
RL	rechts-links Abstand zwischen den Pfotenabdrücken
s.c.	subcutan
S.D.	Standard deviation
S.E.M.	Standard error of mean (Standardfehler)
SP	Substanz P
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNFR1	TNF-Rezeptor-1
TNFR2	TNF-Rezeptor-2
VT	Vortestung
ZNS	Zentrales Nervensystem

chemische Größen

$\text{AlCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Aluminiumchlorid
H_2O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaNO_2	Natriumnitrit
NO	Stickstoffmonoxid

physikalische Größen

cm	Zentimeter
d	Tag
g	Gramm
G	Gauge
h	Stunde
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
n	Anzahl
nmol	Nanomol
p	Signifikanzniveau
s	Sekunden
U/min	Umdrehungen pro Minute
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Afferente Mechanismen	5
2.1.1	Nozizeptoren und Schmerzentstehung	5
2.1.2	Periphere Sensibilisierung	6
2.1.3	Zentrale Sensibilisierung	8
2.1.4	Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung	9
2.1.4.1	Spinale NMDA-Rezeptoren.....	9
2.1.4.2	Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und dem Nervensystem	12
2.1.4.3	Das spinale Opiatsystem	14
2.2	Efferente Mechanismen	16
2.2.1	Das sympathische Nervensystem	16
2.2.2	Das parasympathische Nervensystem	18
2.2.3	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse).....	19
2.2.4	Zusammenspiel von ZNS und Immunsystem bei einer Entzündung	20
2.3	Zielstellung	21
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Versuchstiere.....	23
3.2	Entzündungsmodelle	23
3.2.1	Kaolin – Carrageenan – Modell (K/C-Arthritis).....	23
3.2.2	Antigen-induzierte Arthritis.....	24
3.3	Rückenmarksnahe Applikation	25
3.3.1	Bestimmung einer wirksamen Ketamindosis	25
3.3.2	Rückenmarksnahe Substanzapplikation am narkotisierten Tier (Protokoll I) ..	27
3.3.2.1	Präparation der Versuchstiere	27
3.3.2.2	Substanzapplikation	28
3.3.2.3	Bestimmung der Ketamin-Konzentration im Serum	29
3.3.3	Intrathekale Substanzapplikation am wachen Tier (Protokoll II).....	30
3.3.3.1	Herstellung der Katheter.....	30
3.3.3.2	Intrathekale Katheteranlage.....	30
3.3.3.3	Pumpenanlage	31
3.3.3.4	Versuchsaufbau.....	33

3.4	Kniegelenkschwellung und Körpergewicht	35
3.5	Verhaltenstestung	35
3.5.1	Motorische Verhaltenstests	35
3.5.1.1	Dynamische Testung	35
3.5.1.2	Statische Testung	36
3.5.2	Schmerzassoziiertes Verhalten	37
3.5.2.1	Messung der primären mechanischen Hyperalgesie.....	37
3.5.2.2	Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie	37
3.5.2.3	Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie.....	38
3.6	Gewebeentnahme.....	38
3.7	Bestimmung der Etanercept-Konzentration im Serum	39
3.8	Aufarbeitung der Gewebe	39
3.8.1	Kniegelenke	39
3.8.2	Rückenmark	40
3.9	Histologische Bewertung	40
3.9.1	Histopathologische Bewertung der Antigen-induzierten Arthritis.....	40
3.9.2	Histologische Bewertung des Rückenmarks	42
3.10	Statistische Analyse.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Bestimmung einer wirksamen Ketamindosis	44
4.1.1	Auslösung der Arthritis	44
4.1.2	Intrathekale Ketaminapplikation.....	44
4.1.3	Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich der primären mechanischen Hyperalgesie	44
4.1.4	Wahl der Dosierung.....	46
4.2	Rückenmarksnahe Substanzapplikation am narkotisierten Tier (Protokoll I)	46
4.2.1	Auslösung der Arthritis	46
4.2.2	Ausprägung der Kniegelenksschwellung	47
4.2.3	Histologie der Kniegelenke.....	47
4.2.4	Bestimmung der Ketamindosis in der Peripherie	48
4.3	Kontinuierliche intrathekale Substanzapplikation am wachen Tier (Protokoll II).....	48

4.3.1	Intrathekale Applikation von Ketamin.....	49
4.3.1.1	Schwere der Entzündung	49
4.3.1.1.1	Schwellung	49
4.3.1.1.2	Histologie der Kniegelenke	50
4.3.1.2	Motorische Verhaltenstests.....	52
4.3.1.2.1	Dynamische Testung	52
4.3.1.2.2	Statische Testung	53
4.3.1.3	Schmerzassoziierte Verhaltenstests	54
4.3.1.3.1	Messung der primär mechanischen Hyperalgesie.....	54
4.3.1.3.2	Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie	55
4.3.1.3.3	Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie.....	55
4.3.2	Intrathekale Applikation von Etanercept	56
4.3.2.1	Schwere der Entzündung	56
4.3.2.1.1	Schwellung	56
4.3.2.1.2	Histologie der Kniegelenke	57
4.3.2.2	Motorische Verhaltenstests.....	58
4.3.2.2.1	Dynamische Testung	58
4.3.2.2.2	Statische Testung	59
4.3.2.3	Schmerzassoziierte Verhaltenstests	60
4.3.2.3.1	Messung der primär mechanischen Hyperalgesie.....	60
4.3.2.3.2	Messung der sekundär mechanischen Hyperalgesie	60
4.3.2.3.3	Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie.....	61
4.3.2.4	Bestimmung der Etanercept-Konzentration im Serum	61
4.3.3	Intrathekale Applikation von Morphin.....	61
4.3.3.1	Schwere der Entzündung	62
4.3.3.1.1	Schwellung	62
4.3.3.1.2	Histologie der Kniegelenke	62
4.3.3.2	Motorische Verhaltenstests.....	63
4.3.3.2.1	Dynamische Testung	63
4.3.3.2.2	Statische Testung	64
4.3.3.3	Schmerzassoziierte Verhaltenstests	65
4.3.3.3.1	Messung der primären mechanischen Hyperalgesie.....	65
4.3.3.3.2	Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie	66
4.3.3.3.3	Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie.....	66
4.4	Zusammenfassung.....	67
4.5	Histologie des Rückenmarks.....	68
5	Diskussion.....	70

5.1	Intrathekale Ketamingabe	70
5.2	Intrathekale Etanerceptgabe	74
5.3	Intrathekale Morphingabe	78
5.4	Vergleich zwischen den Gruppen	81
5.5	Diskussion des Modells	82
5.6	Übertragbarkeit und Nutzen des Modells	85
5.7	Schlussfolgerungen	86
	Literaturverzeichnis	87
	Anhang	107
	Danksagung	107
	Lebenslauf	108
	Eigene Veröffentlichung	109
	Ehrenwörtliche Erklärung	110

1 Zusammenfassung

Arthritiden wie beispielsweise die rheumatoide Arthritis stellen auf Grund ihrer Häufigkeit, der Schwere der Symptome sowie der entstehenden krankheitsbezogenen Kosten sowohl gesundheitlich als auch gesundheitspolitisch eine Herausforderung dar. Die diesen Erkrankungen zu Grunde liegenden Mechanismen sind bislang nur unzureichend verstanden.

Es gibt Hinweise, dass Entzündungsreaktionen an Gelenken durch das Nervensystem moduliert werden können. Dabei bildet das Rückenmark eine mögliche Schnittstelle zwischen Afferenzen und Efferenzen. Nozizeptive Gelenkafferenzen ziehen zum Rückenmark, wo eine erste Verschaltung, aber auch eine signifikante Modulation stattfindet. So sind spinale Mechanismen maßgeblich an der Entstehung einer entzündungsbedingten zentralen Sensibilisierung beteiligt. Dabei kommt es zur Übererregbarkeit spinaler Neurone, so dass diese bei nozizeptiven Input größere Antworten aufweisen als unter normalen Bedingungen (Hyperalgesie) bzw. auch durch nicht-schmerzhafte Reize aktivierbar sind (Allodynie). Zusammen mit der Sensibilisierung nozizeptiver Primärafferenzen (periphere Sensibilisierung) bildet die zentrale Sensibilisierung eine bedeutende Grundlage für entzündungsbedingten Gelenkschmerz. Als Mechanismen werden die Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, aber auch die spinale Freisetzung von Zytokinen diskutiert. Hingegen können spinale Opiode diesem Phänomen entgegen wirken.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, den rückwirkenden Einfluss der zentralen Sensibilisierung auf eine periphere Entzündung zu untersuchen. So wurde die Hypothese überprüft, inwieweit spinale NMDA-Rezeptoren, spinale Zytokine (hier v.a. Tumornekrosefaktor- α , TNF- α) sowie das spinale Opiatsystem in einem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis Schmerz, Motorik und Entzündung beeinflussen können.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde bei Ratten eine Antigen-induzierte Arthritis ausgelöst. Über einen intrathekal implantierten Katheter wurde dann während des Beobachtungszeitraums von 3 Wochen mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe kontinuierlich eine der drei Substanzen Ketamin, Etanercept oder Morphin appliziert. Während dieser Zeit wurden das schmerzassoziierte und das motorische Verhalten, aber auch die Entzündungsantwort mit Hilfe einer Reihe

von Verhaltenstests untersucht. Weiterhin wurde die Entzündungsreaktion mittels histopathologischer Zeichen quantifiziert.

Im Vergleich der 3 getesteten Substanzen zeigte Etanercept den größten antiinflammatorischen Effekt, da die Kniegelenksschwellung sowie die histologischen Veränderungen im Kniegelenk bei diesen Tieren am geringsten ausgeprägt waren. Die Ketamin-behandelten Tiere wiesen einen weniger starken antientzündlichen Effekt auf, da sowohl die Schwellung als auch die histopathologischen Entzündungszeichen zumindest im Rahmen der kontinuierlichen Behandlung schwerwiegender als bei den Etanercept-behandelten Ratten waren. Dagegen schien Ketamin eine deutliche Reduktion der akuten Entzündungsantwort zu bewirken. Morphin zeigte keinen antientzündlichen Effekt.

Hinsichtlich des Entzündungs-assoziierten Schmerzes zeigte Ketamin den größten antinozizeptiven Effekt, da es sowohl die primäre als auch die sekundäre Hyperalgesie verminderte. Bei Etanercept war der antinozizeptive Effekt etwas geringer ausgeprägt, da vor allem die primäre, aber kaum die sekundäre Hyperalgesie beeinflusst wurde. Morphin wies die geringste antinozizeptive Wirkung auf.

Auf das motorische Verhalten wirkte Ketamin am effektivsten, da das Gangbild der Ratten am geringsten beeinträchtigt war und sich sowohl in der Gewichtsverlagerung als auch im Gangbild ab Tag 7 eine komplette Normalisierung im Sinne eines Zustandes wie vor der Entzündungsauslösung einstellte. Sowohl Etanercept als auch Morphin wiesen nur eine geringe Wirkung auf das motorische Verhalten auf.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass das zentrale Nervensystem an der Steuerung der periphereren Entzündung zu einem signifikanten Anteil beteiligt ist und vor allem spinale Zytokine, sowie in geringerer Ausprägung auch NMDA-Rezeptoren, dabei eine wichtige Rolle spielen.

Auf Grund dieser Befunde scheint es möglich, dass therapierefraktäre Entzündungszustände möglicherweise durch eine adjuvante pharmakologische Intervention auf Rückenmarksebene positiv beeinflusst werden können.

2 Einleitung

Die rheumatoide Arthritis (RA) zählt zu den häufigsten rheumatologischen Erkrankungen mit deutlichen volkswirtschaftlichen Auswirkungen, die durch die Chronizität der Beschwerden sowie der daraus resultierenden jahrelangen Behandlung und Betreuung bedingt sind (Rosery et al., 2005). Außerdem entstehen aufgrund der gesundheitlichen Probleme weitere Kosten durch Arbeitsausfall und Frühberentung. Die mit der Entzündungsreaktion an verschiedenen Gelenken einhergehende Destruktion von Knorpel- und Knochengewebe führt zu funktionellen Einschränkungen. Des Weiteren treten bei diesen Patienten chronische Tiefenschmerzen auf, die die Lebensqualität enorm beeinträchtigen. Darüber hinaus führt diese Symptomatik zum Auftreten von Kraftlosigkeit und trägt so über die Gelenkzerstörung hinaus zu einer zusätzlichen Bewegungseinschränkung bei (Harris, 1990).

Etwa 1% der Menschen in den westlichen Industrieländern leiden an RA, wobei Frauen drei Mal öfter betroffen sind als Männer. Obwohl die Forschung zum Verständnis der RA in den letzten Jahren viele Fortschritte gemacht hat, ist die Ursache der Erkrankung immer noch nicht geklärt. Es werden verschiedene Auslöser diskutiert: 1. eine Fehlsteuerung des Immunsystems, 2. Infektionserreger und 3. eine erbliche Veranlagung (Hammer, 2004). Die RA befällt bevorzugt die kleinen Gelenke der Hand (mit Ausnahme der distalen Interphalangealgelenke) und des Fußes. Histologisch findet sich eine Trias aus synovialer Hyperplasie, entzündlicher Infiltration und Gelenkdestruktion.

Ein Großteil der Erkenntnisse der zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen der RA stammt aus experimentellen Arthritismodellen, die Ähnlichkeiten mit der RA beim Menschen aufweisen. Durch die Reproduzierbarkeit und Durchführung unter definierten Bedingungen lassen sich dabei nicht nur einzelne Pathomechanismen untersuchen, sondern auch neue Pharmaka testen.

Im Rahmen einer Entzündung wie einer Arthritis im Kniegelenk treten neben den Lokalreaktionen Rötung, Erwärmung, Schwellung auch Schmerzen auf. Diese weisen als neurophysiologisches Korrelat eine gesteigerte Aktionspotentialfrequenz in den dazugehörigen afferenten Neuronen auf. Diese Erhöhung ist auf Mechanismen der peripheren (an den Primärafferenzen) und zentralen Sensibilisierung (auf der Ebene des Zentralen Nervensystems, insbesondere des Rückenmarks) zurückzuführen (Abbildung 2.1). Dabei kommt es

auch zu Veränderungen in der Expression von Ionen- und Rezeptorproteinen, die eine erhöhte Erregbarkeit des Nervengewebes zur Folge haben.

Zusätzlich zu diesen beschriebenen afferenten Mechanismen gibt es auch Hinweise darauf, dass neuronale Efferenzen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen in der Peripherie nehmen können. So ist zum Beispiel bekannt, dass das sympathische Nervensystem eine periphere Entzündung auf der einen Seite aufrechterhalten und verschlimmern, aber andererseits auch lindern kann (Miao et al., 1996). Des Weiteren wurde in anderen Arbeiten gezeigt, dass das parasympathische Nervensystem durch die Ausschüttung von Acetylcholin Entzündungszellen in ihrer Reaktivität deutlich herabsetzen und aus diesem Grund möglicherweise antientzündlich wirken kann (Pavlov et al., 2003). Schließlich kann auch das afferente Axon über einen Reflexbogen selbst Neuropeptide in der Peripherie ausschütten, die zu einer Verstärkung der Entzündungsantwort führen können (sog. Axon-Reflex) (Willis, 1999).

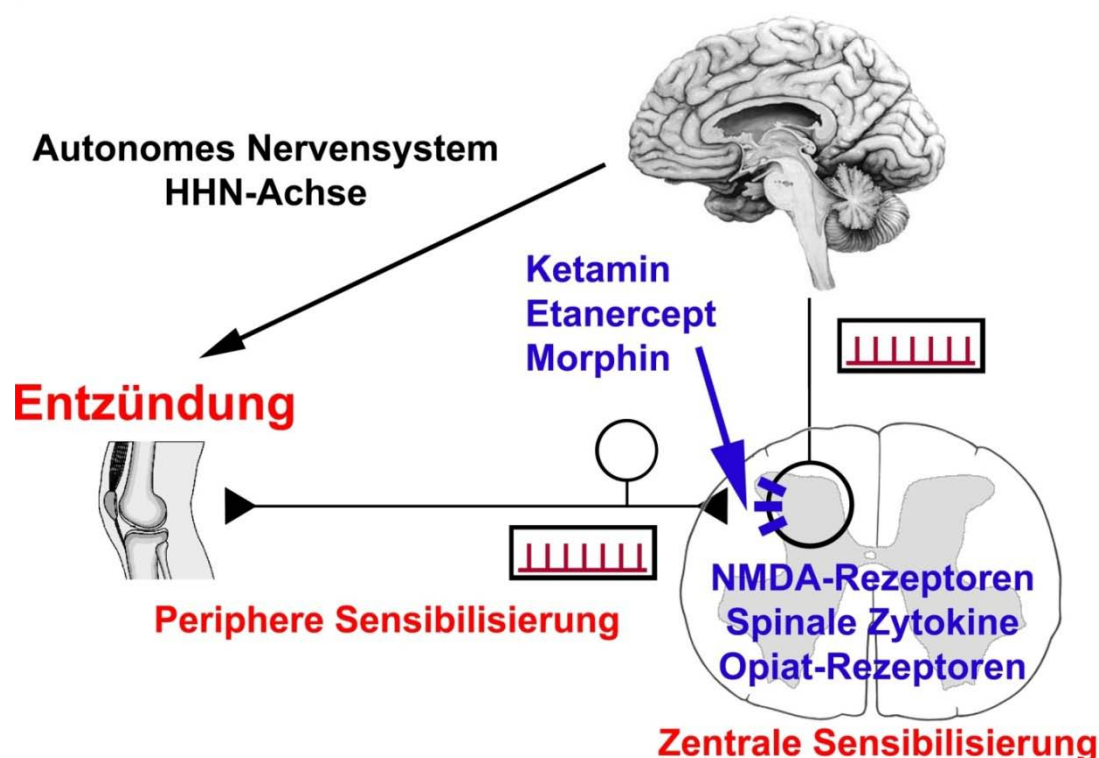


Abbildung 2.1.: Neuronal-immunologische Interaktionen (siehe Text)

2.1 Afferente Mechanismen

2.1.1 Nozizeptoren und Schmerzentscheidung

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts führte Sir Charles Sherrington den Begriff Nozizeption ein, der sich vom lateinischen Wort „nocere“, was so viel wie schädigen bedeutet, ableitet (Sherrington, 1903). Nozizeptoren sind Endigungen von Nervenfasern mit geringem Durchmesser, die entweder nicht-myelinisiert (C-Fasern) oder dünn-myelinisiert (A δ -Fasern) sind. Die nozizeptiven Afferenzen zählen zu den langsam leitenden Nervenfasern (Schaible und Grubb, 1993). Diese Nervenfasern bilden Verzweigungen im gesamten Gewebe aus. Nozizeptoren können durch verschiedenartige Reize aktiviert werden, wie beispielsweise mechanische, thermische, elektrische und chemische Reize. Aus diesem Grund werden sie auch als polymodal bezeichnet (Messlinger, 1997). Zur Aktivierung von Nozizeptoren sind hohe Reizintensitäten erforderlich. Neben diesen polymodalen Nozizeptoren sind in allen Geweben auch sogenannte initial mechanoinsensitive (stumme) Nozizeptoren vorhanden. Diese Nervenfasern reagieren unter normalen Bedingungen nicht auf noxische Reize. Sie werden jedoch bei Gewebeschädigung bzw. Entzündungen sensibilisiert und beginnen dann, auf noxische Stimuli zu antworten [sog. periphere Sensibilisierung, s.u. (Grigg et al., 1986; Schaible und Grubb, 1993)]. Eine derartige Sensibilisierung tritt höchstwahrscheinlich auch im Rahmen einer RA an den entzündeten Gelenken auf, da auch hier sensibilisierende Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden.

Die nozizeptiven Afferenzen ziehen zum Rückenmark und aktivieren dort sensorische nozizeptive Neurone des Hinterhorns der grauen Substanz (Willis und Coggeshall, 2004). Die Erregungsschwelle der Rückenmarkneurone wird vom afferenten Eingang, von intrinsischen Eigenschaften der Zellen und von deszendierenden Eingängen bestimmt (Schaible, 2007). Der überwiegende Teil der nozizeptiven Zellen sind sogenannte „Wide-dynamic-range-Neurone“. Sie antworten auf nicht-noxische Reize mit einer niedrigen Entladungsfrequenz, da sie zusätzlich zum afferenten Eingang von Nozizeptoren auch einen von niederschweligen Mechanorezeptoren erhalten. Diese Zellen weisen aber eine stärkere Antwort auf noxische Reize auf. Ein kleiner Anteil der nozizeptiven Neurone ist nozizeptiv spezifisch, d.h. sie reagieren nur auf noxische Reize (Willis und Coggeshall, 2004). Eine Großzahl der Hinterhornzellen leitet seine

Informationen an andere spinale Neurone im selben Segment weiter; sie sind aufgrund dessen in motorische und vegetative Reflexbögen eingebunden. Diese Verschaltung stellt die Grundlage für nozizeptive Reflexe dar, die durch noxische Reize hervorgerufen werden. Mittels aufsteigender Bahnen aktivieren die Hinterhornneurone das laterale und mediale thalamocorticale System (Treede et al., 1999; Vogt, 2005). Im lateralen System, das aus Relais-Kernen des lateralen Thalamus und der Area SI und SII des Kortex besteht, wird der noxische Reiz hinsichtlich Lokalisation, Dauer und Intensität analysiert, wohingegen das mediale System, das aus Relais-Kernen des zentralen und medialen Thalamus, dem anterioren Gyrus cinguli, der Insel und dem präfrontalen Kortex besteht, die affektive Komponente des Schmerzes erzeugt. Aus letzteren resultieren die im Rahmen schmerzhafter Reize auftretenden aversiven Reaktionen (Schaible und Richter, 2004; Treede et al., 1999).

Das Rückenmark selbst wird von absteigenden Bahnen, welche den nozizeptiven Vorgang auf spinaler Ebene fördern oder abschwächen, beeinflusst. Dieses absteigende nozizeptionshemmende oder -fördernde System besteht aus Bahnen, die dem Hirnstamm, insbesondere dem periaquaeduktalen Grau und dem Nucleus Raphe magnus, entspringen und im dorsolateralen Funiculus des Rückenmarks absteigen (Millan, 2002). Diese absteigenden Bahnen sowie die segmentalen inhibitorischen Neurone gewährleisten eine endogene Kontrolle über die nozizeptive Verarbeitung.

2.1.2 Periphere Sensibilisierung

In einem gesunden Körper erzeugt nur die Applikation von noxischen Reizen eine Erregung des nozizeptiven Systems und löst dadurch Schmerzen aus. Während einer Entzündung reagiert das nozizeptive System empfindlicher. Aus diesem Grund werden Reize, die unter normalen Umständen keinen Schmerz auslösen, als schmerzhaft empfunden (sog. Allodynie). Daneben werden aber auch Reize, die auch in Gesundheit schmerzhaft sind, als intensiver wahrgenommen (sog. Hyperalgesie).

Entzündungen oder Traumata sind mit einer großen Anzahl an Reaktionen verbunden, die aus dem Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren (zellulär, humoral, neural) hervorgehen. Im Zentrum der Betrachtung sollen hier aber nur

die komplexen Veränderungen des nozizeptiven Systems stehen. Während einer Entzündung werden Nozizeptoren sensibilisiert (Bennett, 2000). Ein erstes wichtiges Merkmal sind Spontanentladungen, die zumindest teilweise Ursache für die anhaltenden Schmerzen sind. Ein weiteres Kennzeichen ist die Herabsetzung der Erregungsschwelle, die als elektrophysiologisches Korrelat der Allodynie angesehen werden kann. Die o.g. Hyperalgesie ist zudem durch eine Linksverschiebung der Reiz-Antwort-Kurve bedingt. Diese Phänomene treten bei kurzeinwirkenden Schmerzreizen unter Normalbedingungen nicht auf. Sie sind zurückzuführen auf eine gesteigerte Erregbarkeit peripherer Nozizeptoren (Campbell und Meyer, 1983; Perl et al., 1976). Bei der Entzündung werden aber nicht nur polymodale Nozizeptoren sensibilisiert, sondern es kommt auch zu einer sogenannten Rekrutierung von initial mechanoinsensitiven (stummen) Nozizeptoren. Wie oben bereits erwähnt, zeigen diese Nozizeptoren im gesunden Gewebe keine Reaktion, weder auf nicht-noxische noch auf noxische Reize. Bei Entzündung werden diese Nervenfasern aber mechanosensitiv, sodass sie beginnen, auf mechanische und thermische Reize zu antworten. Die Rekrutierung dieser stummen Nozizeptoren ist eine beachtliche Verstärkung des nozizeptiven Eingangs in das zentrale Nervensystem (ZNS) bei Entzündung (Schaible, 2006). Voraussetzungen für diese Vorgänge sind wahrscheinlich Modulationen der extrazellulären Verhältnisse jkam Ort der Entzündung sowie Interaktionen zwischen Mediatoren und neuronalen Strukturen. Nozizeptoren können durch eine Anzahl körpereigener Substanzen aktiviert und in ihrer Erregbarkeit beeinflusst werden. Zu diesen proinflammatorischen Stoffen, die aufgrund von entzündlichen Reizen in das Gewebe abgegeben werden, zählen u.a. Wasserstoffionen, Bradykinin, Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Zytokine (z.B. Tumor Nekrose Faktor- α , TNF- α) und Neurotrophine (z.B. nerve growth factor, NGF). Diese Mediatoren bedingen Änderungen der Dichte und der Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen und Membranrezeptoren, die sich auf den sensorischen Endigungen von C- und A δ -Fasern befinden (McCleskey und Gold, 1999). Durch die auf diese Weise veränderte Leitfähigkeit von Ionen wird die Schwelle für die Erzeugung von Aktionspotentialen herabgesetzt, wodurch auch die Anzahl der generierten Aktionspotentiale steigt.

Nozizeptoren haben daneben auch eine efferente Funktion. Vor allem C-Fasern setzen Neuropeptide wie Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P

(SP) und Neurokinin A (NKA) bei Erregung aus ihren peripheren oder zentralen Endigungen frei (Kobayashi et al., 2005; Nakamura-Craig und Gill, 1991; Schaible und Grubb, 1993). Diese Substanzen führen zu einer neurogenen Entzündung und fördern die Vasodilatation an den postkapillären Arteriolen (durch CGRP) und steigern die Permeabilität der Gefäßwände (SP, NKA). Vor allem CGRP und SP wirken zudem sensibilisierend auf die sensorischen Endigungen (Nakamura-Craig und Gill, 1991). Zusammenfassend führt die periphere Sensibilisierung zu einem veränderten afferenten Eingang in das Rückenmark, das eine räumliche und zeitliche Bahnung an den zentralen Synapsen bewirkt.

2.1.3 Zentrale Sensibilisierung

Durch die periphere Entzündung verändert sich im Rückenmark die Verarbeitung des nozizeptiven Eingangs. Viele der sekundären nozizeptiven Neurone sind vermehrt erregbar. Dieser Prozess wird als zentrale Sensibilisierung bezeichnet (Basbaum und Wall, 1976; Dougherty und Willis, 1992; LaMotte et al., 1992; Torebjork et al., 1992; Woolf, 1983;). Übererregbare Rückenmarkneurone antworten stärker auf Reize; auf diese Weise verstärkt die zentrale Sensibilisierung die Verarbeitung des nozizeptiven Inputs. Die sensibilisierten Rückenmarkneurone weisen eine Verstärkung der Antwort bei Reizung des verletzten bzw. entzündeten Areals (sog. primäre Hyperalgesie), aber auch der benachbarten gesunden Regionen auf (sog. sekundäre Hyperalgesie). Des Weiteren vergrößern sich die rezeptiven Felder, d.h. die Areale in der Peripherie, von denen aus ein Rückenmarkneuron aktiviert werden kann (Schaible et al., 2005; Willis, 1994; Woolf, 1983). Wahrscheinlich liegt letzteres der sekundären Hyperalgesie zu Grunde (Schaible et al., 2002). So zeigen zum Beispiel spinale Neurone mit Knieeingang auch bei Reizung der normalen Pfote ein gesteigertes Antwortverhalten. Zusätzlich entwickelt ein Teil der zentralen sensorischen Neurone Spontanaktivität (Schaible und Grubb, 1993), was ein möglicher Mechanismus für den im Rahmen einer Entzündung zu beobachtenden Ruheschmerz sein kann. Im sensibilisierten Zustand kann das Rückenmarkneuron nicht nur von A δ - und C-Fasern aktiviert werden, sondern auch von dick-myelinisierten Afferenzen wie beispielsweise A β -Fasern (Willis, 1994; Woolf, 1983). Dies ist wahrscheinlich eine weitere neurophysiologische Voraussetzung

dafür, dass bei pathologischen Zuständen bereits ein leichter Druckreiz, der nur dick-myelinisierte Fasern erregt, Schmerzen auslösen kann (Allodynie).

2.1.4 Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung

2.1.4.1 Spinale NMDA-Rezeptoren

Die zentrale Sensibilisierung wird durch verschiedene Rezeptor-/Transmittersysteme induziert und aufrechterhalten. Eine wichtige Rolle spielt dabei die exzitatorische Aminosäure Glutamat. Für diese gibt es verschiedene Rezeptorklassen, die jeweils nach ihren Liganden benannt werden. Zu den wichtigsten zählen der α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor) sowie der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor). Letzterer ist sehr bedeutend für die synaptische Plastizität bei der zentralen Sensibilisierung (Bennett, 2000; Dickenson, 1990; Dickenson und Sullivan, 1990; Woolf und Thompson, 1991). NMDA-Rezeptoren werden bei Membranpotentialen nahe dem Ruhepotential durch Magnesiumionen blockiert (Nowak et al., 1984). Bindet nun Glutamat an den NMDA-Rezeptor, öffnen sich die Kanalporen zunächst nicht. Dazu bedarf es einer zusätzlichen Depolarisation beispielsweise durch die Aktivierung von AMPA-Kanälen, so dass der Magnesiumblock aufgehoben werden kann (Nowak et al., 1984).

In wachen Tieren verursacht die intrathekale Applikation von NMDA nozizeptives Verhalten (Aanonsen et al., 1990; Cahusac et al., 1984; Raigorodsky und Urca, 1987). Weiterhin konnte in Verhaltensexperimenten die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren an der Entstehung von Hyperalgesie in verschiedenen Schmerzmodellen demonstriert werden. So wurde die Entstehung und Aufrechterhaltung thermischer Hyperalgesie, die bei experimentell hervorgerufenen Mononeuropathien registriert wurde, durch eine Vorbehandlung mit NMDA-Antagonisten, die entweder intraperitoneal (i.p.) oder intrathekal (i.th.) vor und einige Tage nach der Nervenläsion appliziert wurden, verhindert oder abgeschwächt (Davar et al., 1991; Mao et al., 1992a; Mao et al., 1992b; Seltzer et al., 1991). Des Weiteren verhinderte die intrathekale Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten die vermehrten nozizeptiven Antworten im Formalin-Test (Coderre und Melzack, 1992; Murray et al., 1991). Die Schwelle für das Wegziehen der

Pfote nach thermischer Reizung konnte im Verlauf einer Carrageenan- sowie der kompletten Freund's-Adjuvans (CFA)-induzierten subkutanen Entzündung der Pfote durch i.p. und i.th. Applikation von MK-801, einem NMDA-Rezeptor-Antagonisten, erhöht werden (Ren et al., 1992a). Elektrophysiologische Studien haben gezeigt, dass NMDA nozizeptive spinale Neurone erregt (Aanonsen et al., 1990; Anis et al., 1983; Dougherty und Willis, 1991; King et al., 1988; Sher und Mitchell, 1990). NMDA-Rezeptor-Antagonisten unterdrücken in nozizeptiven Neuronen das „wind-up“, den Anstieg der Antworten auf die Aktivierung von C-Fasern bei deren wiederholter Reizung (Davies und Lodge, 1987; Dickenson und Sullivan, 1990; Thompson et al., 1990). Weiterhin konnte die Spontanaktivität sowie die mechanisch ausgelöste Aktivität der Rückenmarkneurone bei Entzündung (Ren et al., 1992b; Schaible et al., 1991) und Ischämie (Sher und Mitchell, 1990) durch NMDA-Antagonisten reduziert werden. In einem weiteren Experiment wurde gezeigt, dass die Applikation von NMDA-Rezeptor-Antagonisten den Anstieg der Reflexantworten von Motoneuronen auf die Gabe von Senföl (Woolf und Thompson, 1991) sowie die Übererregbarkeit von spinothalamischen Neuronen, die durch die Injektion von Capsaicin in die Haut ausgelöst wurde (Dougherty et al., 1992), blockiert, was nahelegt, dass der NMDA-Rezeptor relevant für die Entstehung spinaler Übererregbarkeit ist. Neugebauer et al. (1993) haben gezeigt, dass für die Entwicklung der Übererregbarkeit sowohl NMDA- als auch non-NMDA-Rezeptoren benötigt werden, da die jeweiligen Antagonisten fähig waren, die Veränderungen der Erregbarkeit während einer Entzündung zu verhindern. Des Weiteren konnte die Expansion der rezeptiven Felder durch intravenöse sowie iontophoretische Applikation von NMDA-Antagonisten abgeschwächt werden. Die Verkleinerung der rezeptiven Felder wurde auch in Hinterhornneuronen von Ratten mit CFA-induzierter Entzündung der Pfote nach intravenöser (i.v.) Applikation von MK-801 beobachtet (Ren et al., 1992a).

Auch Neuropeptide wie SP, NKA und CGRP, für die viele Rückenmarkneurone die entsprechenden Rezeptoren exprimieren und deren Freisetzung aus C-Fasern im Rahmen eines peripheren Entzündungsprozesses erhöht ist, können eine langandauernde Depolarisation über Second-messenger-Prozesse vermitteln (Watkins und Evans, 1981) und somit entscheidend zur beschriebenen Übererregbarkeit beitragen (Schaible et al., 2002). Diese Zustände sind

entscheidend für die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch Glutamat, die einen Einstrom von Kalziumionen in die Zelle zur Folge hat (Ascher und Nowak, 1988; MacDermott et al., 1986). Die Verabreichung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten kann die zentrale Sensibilisierung verhindern und eine bestehende Übererregbarkeit vermindern. In Zusammenschau dieser Befunde spielen NMDA-Rezeptoren demnach eine Schlüsselrolle in der Induktion und Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung (Fundytus, 2001).

Ein Vertreter von NMDA-Rezeptor-Antagonisten ist Ketamin. Es wird in einem breiten Spektrum im klinischen Alltag als i.v.-Anästhetikum und Analgetikum genutzt (Eide et al., 1994; Eide et al., 1995; Mathisen et al., 1995; Maurset et al., 1989; Stannard und Porter, 1993). Es ist bekannt, dass Ketamin NMDA-Rezeptoren in einer nicht-kompetitiven Art hemmt (Lodge und Johnson, 1990), indem es an den Ionenkanal bindet, der mit dem NMDA-Rezeptor assoziiert ist und auf diese Weise den Ioneneinstrom verhindert und damit die Aktivierung des Rezeptors blockiert (Wong und Kemp, 1991). Weiterhin zeigten Studien, dass Ketamin Natrium- (Scheller et al., 1996), spannungsabhängige Kalium- (Brau et al., 1997) sowie Kalziumkanäle (Hirota und Lambert, 1996) im ZNS und im Peripheren Nervensystem (PNS) blockiert. Die Hemmung dieser Kanäle spielt ebenfalls eine Rolle in der Ketamin-induzierten Analgesie. Die i.th. und/oder systemische Gabe von Ketamin hat beispielsweise eine starke Reduktion der Hyperalgesie, des spontanen schmerzbezogenen Verhaltens sowie der neuronalen Antworten der spinalen Hinterhornzellen nach intraplantarer Formalin-Injektion gezeigt (Haley et al., 1990; Klimscha et al., 1998; Mao et al., 1993; Qian et al., 1996; Yamamoto und Yaksh, 1992). Erstaunlicherweise zeigte Ketamin auch, im Gegensatz zum nicht-selektiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801, einen analgetischen Effekt für akute Nozizeption, bei der eine NMDA-Rezeptor-Beteiligung eigentlich nicht vermutet wurde (Pekoe und Smith, 1982; Smith et al., 1989; Sonoda und Omote, 1996; Tung und Yaksh, 1981). Verschiedene Verhaltens- und elektrophysiologische Untersuchungen haben angedeutet, dass Ketamin antinozizeptive Effekte aufgrund der Aktivierung des absteigenden hemmenden Systems erzeugt (Okuda, 1986; Pekoe und Smith, 1982; Smith et al., 1989; Sonoda und Omote, 1996; Tonemori et al., 1981). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf spinale Mechanismen der Antinozizeption von Ketamin (Hao et al., 1998; Okuda, 1986; Tung und Yaksh, 1981). Insbesondere eine Beteiligung

des spinalen monoaminergen Systems ist hier von Bedeutung (Crisp et al., 1991; Tung und Yaksh, 1981). Des Weiteren beeinflusst Ketamin die C-Faser-vermittelte nozizeptive Verarbeitung im Rückenmark bei monoarthritischen Ratten stärker als bei gesunden Ratten (Laurido et al., 2001).

2.1.4.2 Wechselwirkungen zwischen Zytokinen und dem Nervensystem

Zytokine sind kleine Regulatorproteine, die von Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und wahrscheinlich auch von Glia gebildet und freigesetzt werden. Einige von ihnen wirken proinflammatorisch, wie Interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 und TNF- α , während andere antiinflammatorisch wirken, wie IL-4, IL-10 und IL-13. Wiederum andere besitzen beide Effekte. Proinflammatorische Zytokine führen in verschiedenen Zellen zur Freisetzung von Prostaglandinen und sympathomimetischen Aminen. IL-1 und TNF- α spielen eine entscheidende Rolle bei der Gewebsdestruktion, die bei chronisch entzündlichen Gelenkserkrankungen wie RA gesehen wird (Dayer, 2002).

Die meisten Wirkungen der Zytokine wurden bisher aus Studien, die die periphere lokale oder systemische Entzündungsreaktion untersucht haben, gewonnen. So konnte gezeigt werden, dass Nozizeptoren Rezeptoren für einige Zytokine besitzen. Auf diese Weise kann TNF- α eine Nozizeptor-Sensibilisierung induzieren. Erste Hinweise darauf, dass Zytokine Hyperalgesie hervorrufen können, konnten durch Studien, die eine Zytokin-Injektion bei Ratten verwendeten, gewonnen werden. So wurde gezeigt, dass die intraplantare Applikation von IL-1 β und TNF- α die mechanischen Schmerzschwellen reduziert (Cunha et al., 1992; Ferreira et al., 1988). Außerdem waren Zytokin-Antagonisten fähig, im Carrageenan-Entzündungsmodell die Hyperalgesie zu reduzieren, was darauf hinweist, dass die Zytokin-Aktivierung einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von Entzündungsschmerz darstellt (Poole et al., 1999). Des Weiteren konnte auch durch die Blockade der proinflammatorischen Zytokine oder durch die Verabreichung antiinflammatorischer Zytokine eine neuropathische Hyperalgesie in Tiermodellen in den meisten Fällen reduziert werden (Sommer, 2001).

TNF- α wird aufgrund seiner Hauptrolle in der Auslösung der Aktivierungskaskade anderer Zytokine und Wachstumsfaktoren in der Entzündungsreaktion weitgehend als Prototyp der proinflammatorischen Zytokine betrachtet. So induziert es die

Bildung von IL-1 β , IL-6 und IL-8. Diese Zytokinkaskade resultiert letztendlich in der Aktivierung der Cyclooxygenase-2 (COX-2)-abhängigen Prostanoidfreisetzung und der Freisetzung von Katecholaminen aus sympathischen Fasern (Poole et al., 1999). Dennoch scheint TNF- α auch unmittelbar auf Nozizeptoren zu wirken. So zeigte die *in vitro* Perfusion von TNF- α an Hinterwurzelganglien eine Auslösung der neuronalen Entladung in A- und C-Fasern, die eindeutig höher und langanhaltender nach Nervenverletzung war, was auf eine gesteigerte Sensibilität von verletzten afferenten Neuronen auf TNF- α hinweist (Schäfers et al., 2003a; Schäfers et al., 2003b). Die Injektion von TNF- α *in vivo* in Hinterwurzelganglien von Ratten erzeugte Allodynie.

TNF- α übt seine Effekte über zwei bekannte Rezeptoren aus, den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) sowie den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) (Smolen und Steine, 2003). Verschiedene Studien beschreiben die Expression beider Subtypen in Hinterwurzelganglien-Neuronen von Ratten (Boettger et al., 2008; Hensellek et al., 2007; Lee et al., 2004; Pollock et al., 2002; Schäfers et al., 2002; Schäfers et al., 2003b), andere konnten hingegen nur TNFR1 in Hinterwurzelganglien-Neuronen lokalisieren, während TNFR2 lediglich in nicht-neuronalen Zellen im Hinterwurzelganglion vorkommen soll (Inglis et al., 2005; Li et al., 2004).

Die genannten Mechanismen sind für die periphere Entzündungsantwort und die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren gut beschrieben. Ob im ZNS ähnliche Mechanismen an der zentralen Sensibilisierung beteiligt sind, ist bislang nur wenig untersucht. Dennoch wurden einige wichtige Erkenntnisse gewonnen. So wurden auch im ZNS TNF-Rezeptoren beschrieben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass viele Zellstrukturen im ZNS beide TNF-Rezeptoren exprimieren können, wenn auch nur im geringem Ausmaß. Dabei wurde die größte TNF-Rezeptor-Verteilung im Hirnstamm gefunden, gefolgt von Thalamus, Basalganglien und Kortex. Die geringste Anzahl an TNF-Rezeptoren wurde im Kleinhirn detektiert (Kinouchi et al., 1991). Untersuchungen deuten darauf hin, dass Mikroglia sowohl TNFR1 als auch TNFR2 besitzt, wohingegen Astrozyten und Oligodendrozyten, deren embryologischer Ursprung sich von dem der Mikroglia unterscheidet, vorwiegend TNFR1 exprimieren (Dopp et al., 1997). Nach Nervenverletzung ist die TNFR1-Expression in Astrozyten gesteigert (Ohtori et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass die Effekte, die mit experimenteller Hyperalgesie in Verbindung gebracht wurden, abhängig von TNFR1 sind (Sommer et al., 1998; Vogel et al., 2000), was im

Einklang mit der Hochregulation von TNFR1 nach experimenteller Nervenläsion steht (Schäfers et al., 2003c; Shubayev und Myers, 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass Mikroglia, wie auch Astrozyten und Neurone durch IL-1, TNF- α und IL-6 aktiviert werden (Perry und Gordon, 1997). Darüber hinaus besitzt die Mikroglia Rezeptoren für Pathogene, wie Viren und Bakterien, und phagozytiert diese. Dieser Prozess bedingt die Freisetzung von IL-1, TNF- α und IL-6 aus der aktivierten Mikroglia (Kreutzberg, 1996).

Die direkte Gabe von IL-1, TNF- α und IL-6 in das Gehirn verursacht eine thermische Hyperalgesie (Oka und Hori, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die spinale Vorbehandlung mit Substanzen, die die Wirkung proinflammatorischer Zytokine neutralisieren, sowohl die thermische Hyperalgesie wie auch die mechanische Allodynie hemmen (Milligan et al., 2000). Diese proinflammatorischen Zytokine werden höchstwahrscheinlich von Glia produziert, da ihre Erzeugung und Freisetzung durch die Blockade der Glia-Aktivierung mittels Fluorocitrat (Milligan et al., 2000) oder Minocyclin (Ledeboer et al., 2005) vermindert wird.

Die Hyperalgesie, die der TNF-Rezeptor-Aktivierung nachgeschaltet ist, wird unter anderem über die p38 MAP-Kinase (MAPK) vermittelt (Ji et al., 2002; Schäfers et al., 2003d). Der TNF- α -Inhibitor Etanercept reduzierte sowohl Allodynie als auch die p38 MAPK-Phosphorylierung (Schäfers et al., 2003d). Etanercept ist ein rekombinantes humanes TNFR p75 – Fc –Fusionsprotein, das für die therapeutische Neutralisation von TNF- α entwickelt wurde (Mohler et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Etanercept die entzündungsbedingten Veränderungen im Gang- und Schmerzverhalten signifikant beeinflusst (Boettger et al., 2008). In elektrophysiologischen Studien wurde beobachtet, dass Etanercept die C-Faser-Antworten auf mechanische Reizungen in verschiedenen Rattenstämmen sowie unterschiedlichen Entzündungsmodellen reduziert. Damit spielt die TNF- α -Signalgebung bei Entzündungszuständen eine wichtige Rolle.

2.1.4.3 Das spinale Opiatsystem

Opioide zählen zu den potentesten Schmerzmitteln überhaupt und werden am häufigsten zur Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen eingesetzt.

Endogene Opioidpeptide wurden vor ca. 30 Jahren entdeckt (Goldstein et al., 1979; Hughes et al., 1975). Kommt es zu einer Bindung an den Opioid-Rezeptor, sowohl durch endogene als auch exogene Opioide, erhöht sich der Kalium-, und vermindert sich der Kalziumstrom in Zellkörpern der sensorischen Neurone (Schroeder et al., 1991; Werz und MacDonald, 1983). Spinale Rezeptoren wurden Anfang der 1970er Jahre entdeckt (Hamber und Viscomi, 1999) und im Rückenmark von Ratten (Pert et al., 1976) und Menschen (Snyder, 1977; Yaksh und Rudy, 1976) nachgewiesen. Im adulten Rückenmark von Säugetieren werden mindestens drei Typen von Opioid-Rezeptoren unterschieden, nämlich μ -, δ - und κ -Rezeptoren (Mack et al., 1984; Traynor und Rance, 1984). Je nach Lokalisation dieser Rezeptoren auf der Synapse besitzen sie verschiedene Funktionen. So hemmt die Öffnung des Kaliumkanals, der bestdokumentierte Effekt der Opioid-Rezeptor-Aktivierung, die Transmitterfreisetzung, wenn der Rezeptor auf der präsynaptischen Endigung lokalisiert ist (Dickenson, 1991; Yaksh, 1993). Auf diese Weise reduziert spinal appliziertes Morphin die Freisetzung von SP und CGRP nach noxischer Reizung (Go und Yaksh, 1987). Im Gegensatz dazu wird die neuronale Aktivität reduziert, wenn der Rezeptor postsynaptisch auf neuronalen Zellkörpern gefunden wird. Autoradiographische und immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass Opioid-Rezeptoren innerhalb des Rückenmarks hauptsächlich in den oberflächlichen Schichten des Hinterhorns zu finden sind (Besse et al., 1990; Rahman et al., 1998). Der größte Anteil (>70 %) befindet sich dabei präsynaptisch auf der zentralen Endigung von C- und A δ -Fasern. Das bedeutet, dass der Hauptmechanismus der spinalen Opioid-Analgesie über die Aktivierung von präsynaptischen Opioid-Rezeptoren vermittelt wird. Die restlichen 30 % sind postsynaptisch auf Interneuronen lokalisiert. Es werden aber auch Opioid-Rezeptoren in der Peripherie gefunden, da sie nach ihrer Synthese entweder zur peripheren oder zentralen Endigung der Fasern translozieren können. Des Weiteren ist ihre Expression in nozizeptiven Primärafferenzen während einer Entzündung erhöht.

Generell ist die antinozizeptive Wirkung von Opioiden bei verschiedenen noxischen Reizen in Tieren mit peripherer Entzündung größer als in Kontrolltieren. Auf diese Weise beeinflussen periphere Entzündungen die zentralen Vorgänge und verändern so die Opioidwirkung. Entzündungen erhöhen die spinale Wirkung von verschiedenen Opioid-Rezeptoren-Agonisten. Allerdings ist dies

unterschiedlich für Agonisten der verschiedenen Rezeptortypen. Die Erhöhung der antinozizeptiven Wirksamkeit von Opioiden überwiegt für μ -Rezeptor-Agonisten, da Morphin, ein μ -Rezeptor-Agonist, eine größere Erhöhung der spinalen Wirkung hervorruft als δ - oder κ -Rezeptor-Agonisten (Hylden et al., 1991). Gen-Knockout-Experimente haben gezeigt, dass μ -Rezeptoren alle Morphinwirkungen vermitteln können (Kieffer und Gaveriaux-Ruff, 2002; Matthes et al., 1996). Der Erhöhung der Wirkung von μ -Rezeptor-Agonisten während einer Entzündung können zudem pharmakodynamische Veränderungen, die am Rezeptor selbst stattfinden, wie gesteigerte Affinität und Zunahme der Anzahl an Rezeptoren, zu Grunde liegen. Während es klare Hinweise für eine Steigerung in der Anzahl von funktionsfähigen peripheren Opioid-Rezeptoren bei Entzündung gibt (Stein, 1994), konnten in vielen anderen Studien an Tieren mit Entzündung keine Veränderungen bezüglich Anzahl oder Affinität von Rezeptoren im Rückenmark (Cesselin et al., 1980; Iadarola et al., 1988) gezeigt werden.

Eines der in der Klinik am häufigsten verwendete Opioid ist Morphin. Es wurde 1806 von dem deutschen Apotheker Friedrich Sertüner (1783-1841) aus dem Saft des Schlafmohns *Papaver somniferum* als erstes Alkaloid isoliert (Hamber und Viscomi, 1999; Sertüner, 1806). Heute gilt es als Goldstandard in der Schmerztherapie. Dabei wirkt i.th. appliziertes Morphin zehn Mal stärker als epidural appliziertes (Bennett et al., 2000).

2.2 Efferente Mechanismen

Über verschiedene efferente Systeme kann die periphere Entzündung durch das ZNS moduliert werden. Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten dargestellt.

2.2.1 Das sympathische Nervensystem

Das sympathische Nervensystem kann sowohl hemmend als auch fördernd auf eine Entzündung wirken. Es konnte gezeigt werden, dass Katecholamine die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, TNF- α und Interferon- γ hemmen und die von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und transforming

growth factor- β stimulieren können (Elenkov und Chrousos, 1999). Durch diesen Mechanismus können Katecholamine eine selektive Unterdrückung von Th₁-Reaktionen verursachen und die Th₂-Reaktion fördern (Elenkov und Chrousos, 1999; Madden et al., 1995). Mit Hilfe einer Sympathektomie konnte die Schwere der Entzündung in einer chronischen Adjuvans-induzierten Arthritis reduziert werden (Jänig et al., 1996; Raja, 1995).

Andererseits können Katecholamine jedoch in bestimmten lokalen Reaktionen und unter bestimmten Bedingungen auch regionale Immunreaktionen durch die Induktion der Bildung von IL-1, TNF- α und IL-8 fördern (ThyagaRajan et al., 1999). Die Denervation noradrenerger Fasern von Lymphknoten ist verbunden mit einer Verschlimmerung der Entzündung (Lorton et al., 1996), wobei jedoch die systemische Sympathektomie oder Denervation von Gelenken in einer verminderten Schwere der Entzündung resultierte (Lorton et al., 1997).

Die Rolle des sympathischen Nervensystems im Rahmen der RA beim Menschen ist bislang unklar. Es wurde beschrieben, dass die regionale Blockade des Sympathikus bei Patienten mit RA einige Merkmale der Krankheit dämpft (Levine et al., 1986). Zudem wurde nachgewiesen, dass β -adrenerge Agonisten die RA beim Menschen vermindern, wie dies auch in Tiermodellen gezeigt werden konnte (Trang et al., 1979).

Verbunden mit der Frage, ob das sympathische Nervensystem die Entzündungsreaktion in der RA modulieren kann, ist die Untersuchung der sympathischen Innervation von Synovialgewebe. Bei Patienten mit Langzeit-RA ist eine signifikante Abnahme der sympathischen Nervenfasern zu erkennen, wohingegen die Substanz P-produzierenden sensorischen Nervenfasern in ihrer Anzahl steigen (Miller et al., 2000; Pereira da Silva und Carmo-Fonseca, 1990), was einen Abfall der antiinflammatorischen Effekte des Sympathikus und eine Erhöhung der proinflammatorischen Effekte des peripheren Nervensystems (PNS) nahelegt.

Neben der hemmenden und fördernden Wirkung des Sympathikus auf die Entzündung hat er auch einen Einfluss auf den entzündungsbedingten Schmerz. Hinsichtlich dieser Feststellung lassen sich folgende Befunde zusammenfassen: Eine sympathische Stimulation sowie die intraartikuläre Injektion von Noradrenalin erregten 35-40 % der C-polymodalen Nozizeptoren in chronisch entzündlichem Gewebe (Sato et al., 1993). Diese adrenerge Aktivierung von Nozizeptoren wurde

durch α_2 -, aber nicht von α_1 -Rezeptorantagonisten geblockt. In menschlicher Haut, die durch topische Applikation von Capsaicin sensibilisiert wurde, dauert die Hyperalgesie an Stellen, an denen exogenes Noradrenalin verabreicht wurde, länger an (Drummond, 1995; Drummond, 1996). Anatomische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Substanz P und NMDA-Rezeptor mRNA nach einer Pfotenentzündung bei Ratten in den präganglionären sympathischen Neuronen hochreguliert sind (Ohtori et al., 2002). Diese Veränderungen suggerieren eine Rolle des sympathischen Nervensystems bei der entzündlichen Hyperalgesie.

2.2.2 Das parasympathische Nervensystem

Das parasympathische Nervensystem kann antiinflammatorisch wirken. So bedingt die Aktivierung von cholinergen Nervenfasern efferenter Vagusnerven die Freisetzung von Acetylcholin an den entsprechenden Synapsen. Die Arbeitsgruppe um Kevin J. Tracey hat Untersuchungen vorgenommen, die den antientzündlichen Effekt des Parasympathikus nachfolgend mit Begriffen wie „cholinerg antiinflammatorischer Mechanismus“ oder aber „Entzündungsreflex“ beschrieben hat (Borovikova et al., 2000; Pavlov et al., 2003; Saeed et al., 2005; Tracey, 2002; Tracey, 2007). In den genannten Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte vagale Aktivität, entweder pharmakologisch oder durch direkte elektrophysiologische Stimulierung hervorgerufen, zu einer herabgesetzten Reaktivität von Entzündungszellen und zu einer verminderten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie etwa aus Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen, führt. Dabei waren vor allem die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α reduziert (I et al., 2003), wohingegen auf die Expression und Freisetzung von antientzündlichen Zytokinen wie IL-10 keine Wirkung erzielt wurde. Diese Untersuchungen wurden bislang entweder *in vitro* an kultivierten Makrophagen oder *in vivo* an Entzündungen des Bauchraums durchgeführt. Jedoch wurden auch in *in vivo* Modellen massiver Entzündungen wie zum Beispiel der Sepsis wiederholt systemische Effekte geschildert. Bei zwei Studien, die einen parasympathischen, cholinerg vermittelten Effekt bei lokalisierten Entzündungsprozessen an den Hinterpfoten von Mäusen, die anatomisch nicht vom Nervus vagus innerviert wurden, untersuchten, wurde eine Verminderung der Entzündungsantwort gefunden (Borovikova et al., 2000; Saeed et al., 2005), was

auf eine Existenz systemischer Effekte schließen lässt. Es existieren zwei experimentell bestätigte Mechanismen, durch die die antientzündliche Wirkung des Nervus vagus erklärt werden kann. Zum einen wird diskutiert, dass durch Entzündungen im Bauchraum aktivierte afferente Fasern des Nervus vagus über den Nucleus tractus solitarius die Hypothalamus-Hypophysen-Achse dahingehend beeinflussen, dass vermehrt Adreno-Kortikotropes-Hormon (ACTH) und Kortisol freigesetzt werden, wobei letzteres zur beschriebenen Verminderung der Entzündungsantwort beitragen soll (Sternberg, 1997; Watkins und Maier, 1999). Auf der anderen Seite sind schlüssige Ergebnisse für einen antiinflammatorischen Effekt efferenter Vagusfasern vorhanden. So konnte gezeigt werden, dass die Reizung der distalen Vagusanteile nach beidseitiger Vagotomie die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Makrophagen herabsetzte (Borovikova et al., 2000).

2.2.3 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse)

Neben dem sympathischen und parasympathischen Nervensystem kann auch die HHN-Achse einen Einfluss auf die periphere Entzündung nehmen. Bei Stimulation dieser Achse wird Kortikotropin-releasing Hormon (CRH) vom paraventriculären Kern des Hypothalamus in das hypophyseale Kapillar-Pfortadersystem freigesetzt. CRH stimuliert dann die Freisetzung von ACTH aus der Adenohypophyse. AVP (Arginin Vasopressin) erhöht synergistisch die CRH-stimulierte ACTH-Freisetzung (Antoni, 1993; Lamberts et al., 1984). ACTH wiederum induziert die Expression und Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebenniere.

Glukokortikoide regulieren eine große Anzahl an immunbezogenen Genen sowie Immunzellexpression und -funktion. Beispielsweise modulieren sie die Expression von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen Entzündungsmediatoren und -molekülen und beeinflussen die Immunzellmigration, deren Reifung und Differenzierung (Adcock und Ito, 2000; Barnes, 1998). Weiterhin verursachen sie einen Th_1 (zelluläre Immunität) – Th_2 (humorale Immunität) Shift in der Immunreaktion, von einem proinflammatorischen Zytokinmuster mit erhöhten IL-1 und TNF- α zu einem antiinflammatorischen Zytokinmuster mit erhöhtem IL-10 und IL-4 (DeRijk et al., 1997; Elenkov und Chrousos, 1999). Pharmakologische Dosen von Glukokortikoiden verursachen eine allgemeine Suppression des

Immunsystems, wobei physiologische Dosen keine vollständigen Immunsuppressoren darstellen, aber die Immunreaktion unter bestimmten Umständen fördern und spezifisch regulieren können. So stimulieren beispielsweise physiologische Konzentrationen von natürlichen Glukokortikoiden (z.B. Kortikosteron) die Überempfindlichkeitsreaktion vom Verzögerungstyp, wohingegen pharmakologische Präparate (z.B. Dexamethason) immunsuppressiv wirken (Dhabhar und McEwen, 1999).

Glukokortikoide üben diese immunmodulatorischen Effekte über einen zytosolischen Rezeptor aus, den Glukokortikoid-Rezeptor (GR). Dies ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor, der, nach Bindung des Liganden, von einem Proteinkomplex dissoziiert, dimerisiert und sich im Kern ansiedelt, wo er an spezifische DNA-Sequenzen (Glukokortikoid-reaktive Elemente) bindet, um die Gentranskription zu regulieren (Aranda und Pascual, 2001). Der GR kann ebenfalls mit anderen Signalkreisläufen in Verbindung stehen, wie Nukleärer Faktor (NF)- κ B und Aktivator-Protein 1 (AP-1), um die Gentranskription zu unterdrücken. Über diese Mechanismen werden viele der beschriebenen antientzündlichen Reaktionen vermittelt (Adcock und Ito, 2000; Herrlich, 2001; Karin und Chang, 2001; McKay und Cidlowski, 1999).

2.2.4 Zusammenspiel von ZNS und Immunsystem bei einer Entzündung

Eine Entzündungsreaktion wird teilweise durch einen bidirektionalen Informationsfluss zwischen Gehirn und Immunsystem reguliert. Dieser umfasst die neuronalen und hormonellen Mechanismen, durch die das Gehirn die Funktion des Immunsystems steuern kann, und umgekehrt Zytokine, die es dem Immunsystem ermöglichen, Einfluss auf das ZNS zu nehmen. Bei einem gesunden Individuum bildet dieses bidirektionale Regulierungssystem eine negative Rückkopplungsschleife, die das Immunsystem und ZNS im Gleichgewicht hält. Eine Störung dieser Regulierungssysteme kann möglicherweise entweder zu einer gesteigerten Aktivierung der Immunreaktion und entzündlichen Krankheit führen oder zu einer gesteigerten Unterdrückung des Immunsystems und einer damit verbundenen erhöhten Anfälligkeit für Infektionskrankheiten (Eskandari et al., 2003).

Es gibt zwei Hauptregelkreise, über die das ZNS das Immunsystem reguliert. Der erste ist die Hormonreaktion, die hauptsächlich über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, aber auch über die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse sowie die Hypothalamus-Wachstumshormon-Achse verläuft. Der zweite ist das autonome Nervensystem, welches über die Freisetzung von Noradrenalin und Acetylcholin aus sympathischen und parasympathischen Nerven wirkt. Andererseits kann das Immunsystem ebenso das ZNS via Zytokinwirkung beeinflussen. Im Gegensatz zu Zytokinen, die innerhalb des ZNS gebildet werden und so eher als Wachstumsfaktoren wirken, verändern Zytokine, die in der Peripherie freigesetzt werden, die Funktion des Gehirns. Auf diese Weise induzieren Zytokine, die am Entzündungsort gebildet werden, im Gehirn ein krankheitsbezogenes Verhalten einschließlich Depression und anderer Symptome (Morag et al., 1998; Reichenberg et al., 2002; Watkins et al., 1995). Darüber hinaus erzeugen Zytokine vor Ort para-/autokrine Effekte auf die Hormonsekretion und Zellproliferation (Kurowska et al., 2002; Ritchlin und Haas-Smith, 2001).

Die Interaktionen zwischen dem neuroendokrinen System und dem Immunsystem stellen ein feinabgestimmtes Regulierungssystem dar, das für die Gesundheit notwendig ist. Daher kann man annehmen, dass Störungen auf jeder Ebene zu Veränderungen in der Anfälligkeit für und der Schwere von Infektions-, Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten führen.

2.3 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war, die Rolle spinaler Mechanismen auf die periphere Entzündung zu untersuchen und somit weitere neuro-immunologische Zusammenhänge aufzuklären. Wie in Abbildung 2.1 ersichtlich, nimmt das Rückenmark als mögliche integrative Schnittstelle zwischen Afferenzen und Efferenzen eine zentrale Position ein. Als vielversprechende spinale Mediatorsysteme, die einerseits im Rahmen der zentralen Sensibilisierung, aber auch, wie oben dargestellt, möglicherweise in der Steuerung einer Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle spielen, sollte im speziellen die Rolle von NMDA-Rezeptoren, von spinalen Zytokinen (hier v.a. TNF- α) sowie des spinalen Opiatsystems erforscht werden. Neben deren Einfluss auf die

Entzündungsreaktion wurden weiterhin Auswirkungen auf Schmerzverhalten und Motorik untersucht.

Zur Bearbeitung dieser Thematik wurde bei Ratten eine Antigen-induzierte Arthritis (AIA, siehe Material und Methoden), die ein Modell für die RA beim Menschen darstellt, ausgelöst und über einen intrathekalen Katheter für einen Zeitraum von drei Wochen kontinuierlich entweder Ketamin, Etanercept oder Morphin appliziert. Während dieser Beobachtungszeit wurden das schmerzassoziierte und das motorische Verhalten sowie die Entzündungsreaktion mit Hilfe einer Reihe von Verhaltenstests untersucht. Der antientzündliche Effekt wurde weiterhin durch eine Histologie der Gelenke objektiviert.

Demnach sollten in den dargestellten Versuchen folgende Hypothesen untersucht werden:

- Die kontinuierliche intrathekale Applikation von Ketamin, Etanercept oder Morphin führt zu einer signifikanten Verminderung der Entzündungsantwort am arthritischen Knie.
- Die kontinuierliche intrathekale Applikation von Ketamin, Etanercept oder Morphin lindert den entzündungsassoziierten Schmerz im Rahmen der Antigen-assoziierten Arthritis.
- Die Beeinflussung spinaler NMDA-Rezeptoren, spinaler Zytokine bzw. des spinalen Opiatsystems führt zu einer Verbesserung der arthritisbedingten Gangauffälligkeiten im Tiermodell.

Die Untersuchung der oben formulierten Fragestellungen soll als Grundlage für weiterführende Untersuchungen des nozizeptiven Systems dazu beitragen, genauere Erkenntnisse über die Funktion spinaler Mechanismen bei peripheren Entzündungen zu erhalten. Das hier erworbene Wissen könnte dazu beitragen, neue Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit RA zu entwickeln.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden weibliche Lewis-Ratten im Alter von 6 - 8 Wochen und einem Gewicht von 160 – 180 g verwendet. Alle Tiere wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen. Die Ratten wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren unter standardisierten Bedingungen bei einem konstanten 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Als Nahrung diente standardisiertes Haltungsfutter (Altromin-Pellets # 1326) und Wasser *ad libitum*. Die Durchführung der Operationen sowie die tierexperimentellen Untersuchungen waren vom Thüringer Landesverwaltungsamt genehmigt (03-025/06 vom 10.08.2006). Die Tierversuche erfolgten gemäß EU-Richtlinien (86/609/EEC) sowie anhand der Empfehlungen der IASP (International Association for the Study of Pain; Zimmermann, 1983).

3.2 Entzündungsmodelle

3.2.1 Kaolin – Carrageenan – Modell (K/C-Arthritis)

Für die Bestimmung einer antinozizeptiven Ketamin-Dosis wurde bei 4 Ratten durch die Injektion von Kaolin (Porzellanstaub) und Carrageenan (Algenextrakt) eine akute Monoarthritis im linken Kniegelenk ausgelöst (siehe Neugebauer et al., 1993; Schaible und Schmidt, 1985). Nach sorgfältiger Desinfektion des linken Beines wurde eine 27-Gauge (G) Nadel (Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) unter Isofluran-Narkose (1,5 – 3 %) (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich, Vertrieb Zweigniederlassung Pfullingen, Deutschland) durch das Ligamentum patellae in den Gelenkspalt eingeführt, 50 µl einer 4%-igen Kaolinlösung (Kaolin, Walther GmbH & Co KG, Kiel) injiziert und die Extremität im Kniegelenk für 5 Minuten langsam gebeugt und gestreckt. Anschließend wurden 50 µl 2%-iges Carrageenan (Carrageenan Lambda, Sigma®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) appliziert und das Bein für weitere 10 Minuten bewegt.

3.2.2 Antigen-induzierte Arthritis

Um die Wirkung von spinal applizierten NMDA-Rezeptor-Antagonisten, Opioid-Rezeptor-Agonisten bzw. TNF α -neutralisierenden Substanzen auf eine chronische Arthritis zu testen, wurde bei 72 (24 im Protokoll I und 48 im Protokoll II) Versuchstieren eine Antigen-induzierte Arthritis (AIA) ausgelöst (Erstbeschreibung bei der Ratte siehe Griffiths, 1992).

Die erste Immunisierung der Ratten erfolgte 21 Tage (d -21) vor Arthritisinduktion (siehe Abb. 3.2) mit 1ml Immunisierungslösung (siehe Tabelle 3.1) subcutan (s.c.) in das obere und untere Drittel der rechten Flanke (2 Depots). Zur Boosterung wurde diese Behandlung 14 Tage (d -14) vor Auslösung der Arthritis wiederholt und die Injektion in das mittlere Drittel der rechten und das untere Drittel der linken Flanke (2 Depots) gesetzt. Die Injektionsstellen wurden gewählt, damit die entstehenden Granulome die Katheter- und Pumpenimplantation nicht behindern. Zwei Wochen nach der Booster-Immunisierung (d 0) erfolgte ebenfalls unter Isoflurannarkose die Auslösung der Arthritis (siehe Abb. 3.2 durch intraartikuläre (i.a.) Injektion von 50 μ l einer sterilen mBSA (methyliertes bovines Serumalbumin) –Lösung (10 mg/ml in physiologischer Kochsalzlösung) in das linke Kniegelenk. Das rechte Kniegelenk blieb unversehrt.

Tabelle 3.1.: Verwendete Substanzen zur Herstellung der Immunisierungslösung (Endmenge: 20 ml)

Substanz	Hersteller	verwendete Konzentration	verwendete Menge
mBSA	Sigma		10 mg
CFA	Sigma	1 mg/ml	10 ml
physiologische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland	0,9 %	10 ml
abgetötetes Mykobakterium tuberculosis H37 Ra	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland		10 mg

3.3 Rückenmarksnahe Applikation

Die Untersuchung der spinalen Mechanismen wurde in zwei Phasen durchgeführt, wobei zunächst die Wirkung der rückenmarksnahen Applikation von NMDA-Rezeptor-Antagonisten am narkotisierten Tier beobachtet wurde. Anschließend wurden die Versuche an wachen Tieren durchgeführt, da der Einfluss des Narkotikums, welches ebenfalls auf Rückenmarksebene wirkt, nicht eindeutig von der Wirkung der NMDA-Rezeptor-Antagonisten zu unterscheiden war. Die angewandten Methoden werden im Folgenden dargestellt.

3.3.1 Bestimmung einer wirksamen Ketamindosis

Da in der Literatur unterschiedliche Konzentrationen von Ketamin bei verschiedenen Studiendesigns verwendet wurden, haben wir in einem Vorversuch eine Dosierungsreihe zur Ermittlung einer antinozizeptiven Konzentration durchgeführt. Wir orientierten uns dabei an den Ketamin-Konzentrationen, die bei Schnoebel (Schnoebel et al., 2005), Laurido (Laurido et al., 2001), Ren (Ren et al., 1992b), Burton (Burton et al., 1999), Ahuja (Ahuja, 1983) und Ghorpade (Ghorpade und Advokat, 1994) verwendet wurden. Hierfür wurden den Tieren 6 Tage vor Beginn der Versuche intrathekale Katheter implantiert (siehe 3.3.3).

Sechs Stunden nach Auslösung der K/C-Arthritis (siehe 3.2.1) wurden in einem aufsteigenden Dosierungsdesign jeweils 10 µl Ketaminlösung (Ketanest® 50, Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland) in den Konzentration 0,125 mg/ml, 1,2 mg/ml, 3,6 mg/ml, 7,2 mg/ml, 20 mg/ml sowie 50 mg/ml intrathekal verabreicht. Zwischen den Applikationen wurden Pausen von einer bis 20 Stunden eingehalten, wobei jeweils 30 Minuten nach der intrathekalen Ketamingabe eine Verhaltenstestung erfolgte, die aus dem Incapacitance-Test (siehe 3.5.1.2) und der Bestimmung der mechanischen Schwellen (siehe 3.5.2.1) bestand, um das schmerzassoziierte Verhalten zu ermitteln (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.1).

Tabelle 3.2.: Schema des Versuchsablaufs der Dosisfindung (n=4)

Zeit	Tiere	Vorgehen
-6 d	1,2,3,4	Anlage intrathekalen Katheter
-1 d	1,2,3,4	Vortestung Verhalten
0	1,2	Auslösung der Arthritis
5½ h	1,2	Verhaltenstestung ohne Ketamingabe
6 h	1,2	Applikation von 0,125 mg/ml Ketamin
6½ h	1,2	Verhaltenstestung
7 h	1,2	Applikation von 1,2 mg/ml Ketamin
7½ h	1,2	Verhaltenstestung
8 h	1,2	Applikation von 3,6 mg/ml Ketamin
8½ h	1,2	Verhaltenstestung
9 h	1,2	Applikation von 7,2 mg/ml Ketamin
9½ h	1,2	Verhaltenstestung
10 h	1,2	Applikation von 20 mg/ml Ketamin
10½ h	1,2	Verhaltenstestung
11 h	1,2	Applikation von 50 mg/ml Ketamin
11½ h	1,2	Verhaltenstestung
24 h	3,4	Auslösung der Arthritis
29 ½ h	3,4	Verhaltenstestung ohne Ketamingabe
30 h	1,2,3,4	Applikation von 20 mg/ml Ketamin
30½ h	1,2,3,4	Verhaltenstestung
50 h	1,2,3,4	Applikation von 20 mg/ml Ketamin
50½ h	1,2,3,4	Verhaltenstestung

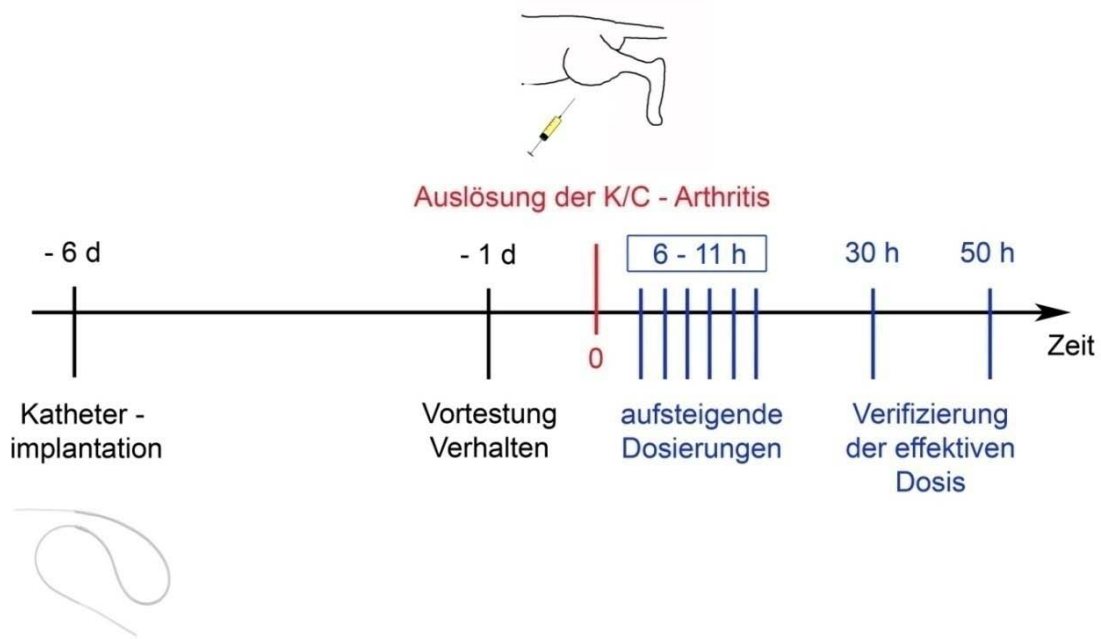


Abbildung 3.1.: Zeitlicher Ablauf bei der Ermittlung einer effektiven antinozizeptiven Ketamindosis

Bei der Auswahl der Etanercept- und Morphin-Konzentrationen richteten wir uns nach den Arbeiten von Boyle (Boyle et al., 2006) bzw. Stevens und Yaksh (Stevens und Yaksh, 1989).

3.3.2 Rückenmarksnahe Substanzapplikation am narkotisierten Tier (Protokoll I)

3.3.2.1 Präparation der Versuchstiere

Für die Experimente wurden 24 bereits zweimal immunisierte Ratten verwendet, die während der Versuchszeit mit Thiopental (Thiopental inresa 0,5 g, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) narkotisiert waren. Die Narkose wurde durch eine initiale Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht (KG) i.p. eingeleitet. Den Tieren wurde zur Atem erleichterung eine Trachealkanüle eingeführt, über die sie spontan ein Gemisch aus Frischluft und Sauerstoff atmeten. Außerdem wurden sowohl in die Arteria carotis communis wie auch in die Vena jugularis externa ein Katheter implantiert. Mit Hilfe des Arterienkatheters konnte ständig der mittlere arterielle Blutdruck gemessen werden, der zwischen 90 und 120 mmHg lag. Zur

Überwachung der Narkosetiefe wurde alle 30 Minuten der Kornealreflex überprüft und bei Auslösbarkeit 20 mg/kg KG i.p. Thiopental nachappliziert. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und über ein Rückkopplungssystem, das an eine Heizdecke angeschlossen war, konstant auf 37°C gehalten.

Damit eine Applikation von Substanzen auf das Rückenmark möglich war, wurde dieses durch eine Laminektomie auf der Höhe von L1-L4 freigelegt. Dazu wurde die paravertebrale Muskulatur nach einem Hautschnitt entfernt und der Kopf des Versuchstieres in einem stereotaktischen Rahmen gespannt. Zur Stabilisierung der Wirbelsäule wurden je 2 Schwanenhalsklemmen auf beiden Seiten unter die Processi transversi geschoben und am Rahmen befestigt. Das Rückenmark wurde dann vorsichtig mit Hilfe einer Knochenzange dorsal freipräpariert, die Dura mit einer Vanna-Schere unter mikroskopischer Sicht eröffnet und die Hautlappen um die Wirbelsäule seitlich am Rahmen mittels einer Haltenaht fixiert. An der Stelle, an der später die Substanz appliziert werden sollte, wurde ein dünnwandiger ovaler Gummiring (ca. 3 x 5 mm) mit Silikongel auf das Rückenmark aufgesetzt.

3.3.2.2 Substanzapplikation

Um den Effekt von zentralen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf eine akute Kniegelenksentzündung zu untersuchen, wurden den Tieren 30 Minuten vor Auslösung der AIA 100 µl der zu testenden Substanz (siehe Tabelle 3.3) auf das abgegrenzte Rückenmarksareal appliziert. Anschließend wurde 6 Mal im Abstand von 60 Minuten die Substanz gewechselt, indem zunächst die Restmenge abpipettiert und anschließend wieder 100 µl der Testsubstanz verabreicht wurden. Eine halbe Stunde nach der letzten Applikation wurden die Tiere durch eine Überdosis Thiopental (120 mg/kg KG) i.v. getötet und anschließend die Kniegelenke wie unter 3.6 beschrieben entnommen und präpariert. Außerdem wurde zur Bestimmung der Ketamin-Konzentration in der Peripherie ca. 5 ml Blut entnommen. Dafür wurde die Axillararterie freigelegt, durchtrennt und das Blut mittels einer Pipette in Monovetten gefüllt. Diese wurden in einer Zentrifuge (Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Osterode) bei 4000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, das Serum in Eppendorfhütchen abpipettiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Ratten wurden in zwei Gruppen geteilt: siehe Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3.: Verwendete Substanzen für die rückenmarksnahe Applikation am narkotisierten Tier

Substanz	Anzahl der Tiere	verwendete Konzentration
Ketamin	12	1,25 mg/ml
Tyrode	12	

Herstellung Tyrode:

Tabelle 3.4.: Verwendete Substanzen zur Herstellung der Tyrode

Substanz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)	127,8 mM
KCl	Fluka	2,5 mM
CaCl	Roth (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland)	9 mM
MgCl	Merck (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland)	2,1 mM
NaHCO ₃	Roth	9,8 mM
NaH ₂ CO ₃	Fluka	0,15 mM
Aqua dest.		

3.3.2.3 Bestimmung der Ketamin-Konzentration im Serum

Bei der spinalen Applikation von Substanzen ist es nicht auszuschließen, dass ein kleiner Anteil über die Blut-Hirn-Schranke bzw. wie in diesem Fall im Rahmen des Operationsgebietes in die Peripherie gelangt. Aufgrund dessen wurde die Ketamin-Konzentration im Serum bestimmt, um festzustellen, ob der Effekt der Ketaminwirkung spinal oder peripher bedingt ist. Dazu wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universität Jena eine Gaschromatographie-Bestimmung an 17 Seren durchgeführt.

3.3.3 Intrathekale Substanzapplikation am wachen Tier (Protokoll II)

3.3.3.1 Herstellung der Katheter

Für den Versuchsaufbau der Dosisfindung war es notwendig jeder Ratte einen intrathekalen Katheter anzulegen. Das Verfahren zur Herstellung solcher Katheter wurde von Yaksh 1976 (Yaksh und Rudy, 1976) erstmals beschrieben und von uns in einer modifizierten Form durchgeführt. Die Katheter bestanden aus einem dünnen, ca. 15 cm langen Polythenschlauch (Portex Non Sterile, Portex, GB (ID: 0,28 mm, AD: 0,61 mm), der bei 8,5 cm markiert wurde, so dass 8,5 und 6,5 cm lange Teilstücke entstanden. An dieser Stelle wurden die Katheter mit Zahnzement (Monophosphatischer Zahnzement, normalhärtend, HAVARD, Dental-GmbH Berlin) benetzt.

Nachdem der Zahnzement ausgehärtet war, wurden die Katheter mit Hilfe einer Hamilton-Spritze (Hamilton Company, Reno, Nevada) und einer Kanüle (Einmal-Injektionskanüle, Sterican® Ø 0,30 x 12 mm, 30 G x ½", Braun) auf Durchgängigkeit geprüft.

Für die Versuche der kontinuierlichen intrathekalen Substanzapplikation (Protokoll II) wurden Fertig-Katheter (Rat intrathecal catheter, Alzet®, Durect Corporation, Cupertino CA, USA) eingesetzt.

3.3.3.2 Intrathekale Katheteranlage

Die operative Katheteranlage, ebenfalls von Yaksh (Yaksh und Rudy, 1976) entwickelt, wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,5 – 3 %) durchgeführt. Vor dem Eingriff wurde das Operationsgebiet rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Dann wurden die Tiere in einen Rahmen mit stereotaktischer Halterung, an den eine Narkosemaske zur kontinuierlichen Narkosegabe angeschlossen war, eingespannt. Zunächst wurde das Os occipitale aufgesucht und mit dem Skalpell (Klinge: No.21, P.J. Dahlhausen & Co GmbH, Köln) ein medianer Längsschnitt von ca. 3 cm durch die Haut gesetzt. Dabei diente die Vertiefung zwischen linker und rechter Protuberantia occipitalis externa als Orientierungspunkt. Danach wurde mit einem kleineren Skalpell (Klinge: No.15, Dahlhausen) ein ca. 1 cm breiter waagerechter Schnitt unter dem Os occipitale gesetzt und der Muskel bis

zum 1. HWK solange stumpf abpräpariert, bis die Dura sichtbar wurde. Dann wurde das Operationsgebiet von hinten mit einem Retraktionshaken offen gehalten. Anschließend wurde die Dura mit einer Kanüle (Einmal-Injektionskanüle, Sterican® Ø 0,70 x 30 mm, 22 G x 1¼", Gr.12, Braun) über dem ersten Wirbelkörper perforiert. Damit diese Öffnung nicht zu tief wurde und keine wichtigen Strukturen verletzt wurden, wurde die Spitze der Kanüle um 90° umgebogen. Der Katheter wurde mit dem dünneren Teil voran mittels zweier Pinzetten so in den Spinalraum eingeführt, dass er auf Höhe der lumbalen Erweiterung zu liegen kam, was einer Länge von ca. 8,2 cm entspricht. Die kraniale Fixierung erfolgte durch den Zahnzementknoten. Das Verschieben des Katheters erfolgte mit größter Vorsicht, um das Risiko Nervenwurzeln abzureißen bzw. zu verletzen und dadurch den Ratten Paresen zuzufügen, so gering wie möglich zu halten. Die Muskulatur wurde dann mit einer Tabaksbeutelnaht vernäht. Der dicke Teil des Katheters wurde mit Hartklebewachs (Deiberit 502, Dr. Böhme & Schöps Dental GmbH, Goslar, Deutschland) verschlossen und in eine Hauttasche am Rücken geschoben. Dann wurde die Haut mit Doppelnähten zugenäht.

Bei den zur Dosisfindung benutzten Tieren wurde, nachdem der Knoten auf der Öffnung zu liegen kam, der Katheter oberhalb des Os occipitale durch eine Kanüle (Einmal-Injektionskanüle, Sterican®, 0,90 x 40 mm, 20 G x 1 ½", Gr. 1, Braun) nach außen getunnelt. Danach wurde die Muskulatur und Haut wie oben erwähnt vernäht. Der Teil des Katheters, der nun nach außen endete, wurde auf ca. 2-3 cm gekürzt, desinfiziert und mit einem Stück Draht verschlossen, sodass keine Fremdstoffe hineingelangen konnten.

3.3.3.3 Pumpenanlage

Um den Versuchstieren die zu testenden Substanzen möglichst stressfrei, gut verträglich und kontinuierlich über einen langen Zeitraum zu verabreichen, wurden ihnen osmotische Minipumpen (osmotische Pumpe Model 2ML4 2,5 µl/h 28 d, Alzet®, Durect Corporation, Cupertino CA, USA) subcutan implantiert. Diese Pumpen bestehen aus einer äußeren semipermeablen Membran, die eine osmotisch wirksame Substanz (hochkonzentrierte Natriumchloridlösung) enthält, sowie einer inneren nicht-permeablen, jedoch flexiblen Wand, die die zu

verabreichende Substanz umschließt. Die Funktionsweise der Pumpe beruht auf einem Einströmen von Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran und der daraus folgenden Volumenerhöhung in der äußeren Kammer. Dadurch wird die innere Kammer komprimiert und die Testflüssigkeit gelangt durch eine Auslauföffnung in den Katheter.

Die Implantation erfolge unter Isofluran Narkose. Der Rücken der Ratten wurde rasiert und danach gründlich desinfiziert. Es wurde ein ca. 4 cm langer medianer Hautschnitt gesetzt und anschließend die Haut von der Muskulatur gelöst. Danach wurde der Katheter aufgesucht und das blind verschlossene Ende abgeschnitten. Mit 0,9% -iger isotonischer Kochsalzlösung wurde er auf Durchgängigkeit geprüft. Bei den Kontrolltieren, die keine Substanz appliziert bekamen, wurde der Katheter wieder mit Hartklebewachs verschlossen. Für die übrigen drei Gruppen wurden die Pumpen laut Beschreibung mit Ketamin, Etanercept (Enbrel, Wyeth Pharma GmbH, Münster) bzw. Morphin (Sigma) befüllt (Konzentrationen siehe Tabelle 3.5). Diese wurden in die vorgefertigte Tasche zwischen Haut und Muskulatur geschoben und an die Katheter angeschlossen. Zusätzlich wurde bei den Kontrolltieren (Sham) die Pumpe mit isotonischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi) befüllt, der Katheter aber nicht mit der Pumpe verbunden. Um das Risiko einer Pumpenablösung während der Versuchsreihe zu minimieren, wurde die Verbindungsstelle mit Hilfe eines Dreifachknoten aus chirurgischem Nahtmaterial gesichert. Abschließend wurde die Haut mittels Doppelnaht zugenäht.

Nach den beschriebenen Operationen wurden die Tiere über ca. zwei Stunden auf ihr Befinden kontrolliert. Alle Tiere erholten sich innerhalb eines Tages. Die Heilung der Hautwunde verlief stets komplikationslos. Die Pumpen wurden über die Versuchszeiträume gut toleriert, und das Verhalten durch sie nicht beeinflusst.

Tabelle 3.5.: Konzentrationen der verwendeten Substanzen sowie die zugehörige applizierte Dosis über die Minipumpen

Substanz	Konzentration	Pumpleistung (Hersteller)	applizierte Dosis
Ketamin	20 mg/ml	2,5 µl/h	50 µg/h
Etanercept	2,63 mg/ml	2,5 µl/h	6,575 µg/h
Morphin	2 mg/ml	2,5 µl/h	5 µg/h
Kochsalz	0,9 %	2,5 µl/h	

3.3.3.4 Versuchsaufbau

Wie in Abbildung 3.2 dargestellt erfolgte die Immunisierung der Ratten 21 und 14 Tage vor der Arthritisauslösung (siehe 3.2.2). Die Katheter wurden 4 Wochen, die Pumpen drei Tage vor der Induktion der AIA implantiert. An den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21 nach sowie zu 2 Zeitpunkten vor Auslösung der Entzündung (zur Gewöhnung der Tiere an die Apparaturen sowie zur Bestimmung von Ausgangswerten) wurden das motorische und schmerzassoziierte Verhalten getestet sowie das Körpergewicht und die Durchmesser der Kniegelenke bestimmt.

An Tag 21 wurden die Ratten mit einer Überdosis Trapanal i.p. tief narkotisiert. Anschließend wurde der Brustkorb eröffnet und aus dem rechten Ventrikel ca. 5 ml Blut entnommen, in Serumröhrchen gefüllt, zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Tiere über eine in den linken Ventrikel eingebrachte Kanüle (Vasofix® Braunüle® 17G, Braun) in 3 Schritten á 15 Minuten perfundiert. Dabei wurde zunächst 40°C warmer PBS Puffer, der mit 0,1% NaNO₂ und Heparin versetzt war (siehe Tabelle 3.6), durch das Kreislaufsystem gepumpt (Reglo-Digital, MSICALI08-160, Ismathec®, Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld), um das Blut auszuwaschen. Danach wurde zunächst mit 40°C warmem, und anschließend mit 4°C kaltem 4 %-igem Paraformaldahyd (siehe Tabelle 3.7) perfundiert, um eine möglichst gute Erhaltung der zu untersuchenden Gewebe zu gewährleisten. Nach diesen 45 Minuten wurden, wie unter 3.6 und 3.8 beschrieben, die Kniegelenke sowie das Rückenmark entnommen.

Die Ratten wurden nach der Katheteranlage und den Vortestungen nach Zufallsprinzip den folgenden vier Gruppen zugeteilt:

1. Ketamin (20 mg/ml)
2. Etanercept (2,63 mg / ml)
3. Morphin (2 mg / ml)
4. Kontrollgruppe (Sham) für 1., 2. und 3. (keine Substanzapplikation)

Tabelle 3.6.: Lösung 1: PBS + 0,1% Natriumnitrit + 10.000 U/l Heparin bei 37°C

Substanz	Hersteller	Endkonzentration
NaCl	Fluka	140 mM
KCl	Fluka	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	Merck	1,5 mM
NaH ₂ PO ₄	Merck	8,1 mM
NaNO ₂	Sigma	1 g/l
Heparin	Ratiopharm (Ratiopharm AG, Ulm, Deutschland)	10.000 I.E.

Tabelle 3.7.: Lösung 2: 4 %-ige Paraformaldehydlösung

Substanz	Hersteller	Konzentration
NaH ₂ PO ₄	Merck	2,76 g/l
Na ₂ HPO ₄	Merck	14,24 g/l
Paraformaldehyd	Merck	41,07 g/l
H ₂ O	Braun	Menge: 0,95 l

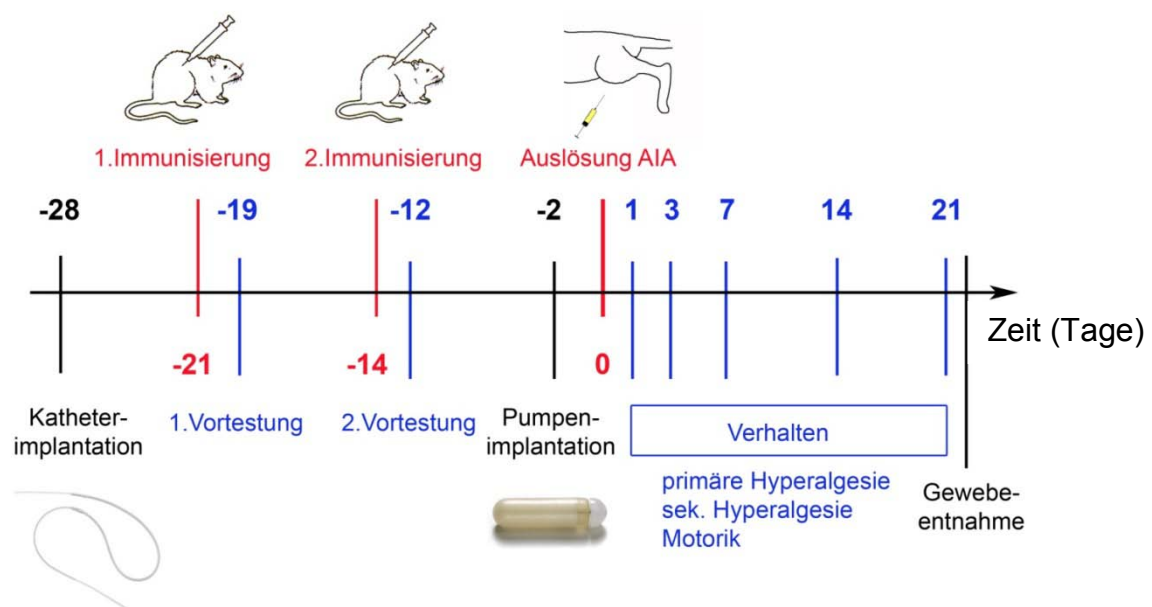


Abbildung 3.2.: Ablauf der Versuchsanordnung des Protokolls II

3.4 Kniegelenkschwellung und Körpergewicht

Die Arthritisinduktion im linken Kniegelenk führte zu einer deutlichen Gelenkschwellung, besonders in der akuten Phase der AIA. Der mediolaterale Durchmesser beider Knie wurde mit einem Oditest–Schnelltaster (Mitutoyo, Neuss, Deutschland) ermittelt. Die Differenz zwischen linkem und rechtem Kniegelenk diente als Maß für die klinische Schwere der Arthritis. Dieser Parameter wurde einmal pro Testtag bestimmt.

Das Körpergewicht als genereller Morbiditätsparameter wurde sowohl zu den Vortestungen als auch an den Tagen der Verhaltenstestung bestimmt.

3.5 Verhaltenstestung

3.5.1 Motorische Verhaltenstests

3.5.1.1 Dynamische Testung

Zur Beurteilung des motorischen Verhaltens steht mit der Bewertung des Gangbildes eine Methode zur Verfügung, die durch de Medinacelli (De Medinacelli et al., 1982) erstmals beschrieben und die hier in einer modifizierten Form angewandt wurde. Zunächst wurden die Hinterpfoten der Ratten mit Stempelfarbe markiert. Die Tiere wurden dann in einen Tunnel, unter dem sich eine Lage Papier befand, gesetzt, welchen sie, ihrem Instinkt, in die Dunkelheit zu laufen, durchliefen. Die Ratten hinterließen dabei auf dem Papier ihre Pfotenabdrücke, an denen folgende Parameter ausgemessen wurden: der Abstand zwischen den Mittelballen der Hinterpfoten (Breite), der Winkel, der durch die Kreuzung der Linien vom rechten und linken Fußabdruck entsteht, die Länge der einzelnen Schritte (links sowie rechts) (LR, RL) und die Schrittlängen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Abdrücken auf einer Seite. Zur Auswertung wurden aber nur die Breite, der Winkel sowie der links-rechts Abstand (LR) der Pfoten herangezogen. Bestimmt wurden nur dann Werte, wenn die Abdrücke fortlaufend abgebildet (mindestens 3 aufeinanderfolgende Abdrücke) und bei denen die Versuchstiere an einem Stück gelaufen waren. In Abbildung 3.3 sind die erhobenen Parameter illustriert.

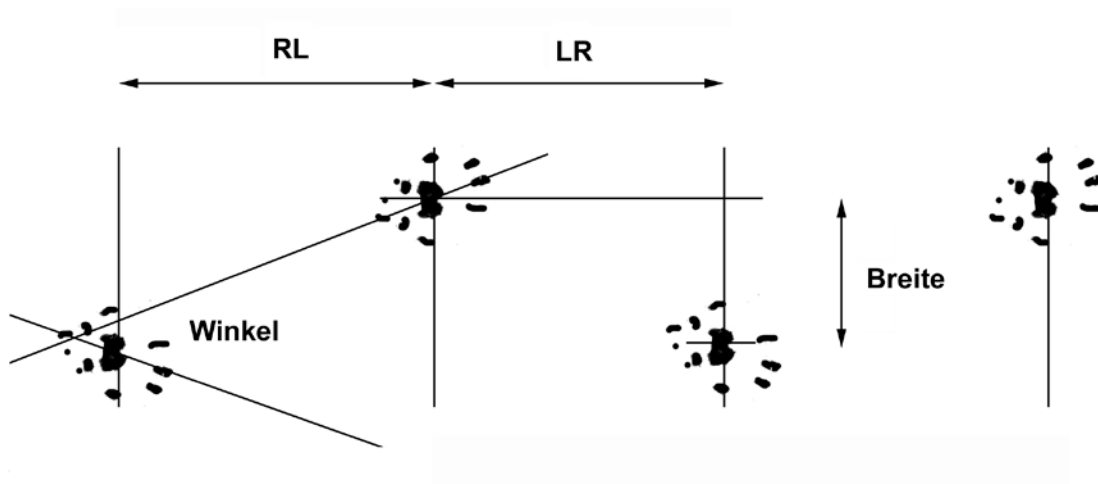


Abbildung 3.3.: Rekonstruktion der Pfotenabdrücke

3.5.1.2 Statische Testung

Zur Bestimmung der Gewichtsverlagerung auf beide Hinterpfoten im Sitzen wurde ein Incapacitance-Tester (Linton Instrumentation, Norfolk, UK) benutzt. Die Apparatur besteht aus zwei Druck-Messfühlern, die so angeordnet sind, dass jeweils das Gewicht, das separat über die einzelnen Hinterpfoten auf den Untergrund übertragen wird, gemessen werden kann. Die Ratten wurden dafür vorsichtig in einer Plexiglaskammer mit ihren Hinterpfoten auf das Zentrum der Druck-Messfühler gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Gewicht auf die Messfühler gerichtet ist und nicht auf die Wände der Kammer geleitet wurde. Die Durchschnittskörpergewichtsverteilung in Gramm wurde über ein Intervall von 3 Sekunden bestimmt. Abweichend von der Ergebnisdarstellung nach Barton et al. (Barton et al., 2007), die die Gewichte, die auf die Hinterpfoten verteilt wurden, ins Verhältnis zueinander setzten, haben wir unsere Resultate nach folgender Formel berechnet (McDougall et al., 2006):

$$\frac{\text{Gewicht linke Pfote}}{\text{Gewicht linke Pfote} + \text{Gewicht rechte Pfote}} \times 100 \%$$

Dabei stellte das Ergebnis von 50 % eine auf beiden Seiten gleich große Belastung, und somit den Normalwert dar. Jedes Tier wurde pro Testtag drei Mal hintereinander gemessen und davon der Mittelwert bestimmt.

3.5.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

3.5.2.1 Messung der primären mechanischen Hyperalgesie

Mit Hilfe eines Dynamometers (Correx, Bern, Schweiz) wurde ein ansteigender Druck auf die laterale Seite des Kniegelenks in Höhe des Gelenkspaltes ausgeübt, bis die Ratten versuchten, ihr Bein wegzuziehen bzw. vokalisiert. Die Gewichtskraft, die diese Antwort auslöste, wurde in Gramm abgelesen. Um Gewebsverletzungen zu verhindern, wurden 250 g als Höchstwert definiert. Es wurden an jedem Versuchstag beide Kniegelenke ein Mal getestet.

3.5.2.2 Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie

Um Veränderungen im Empfinden oder die Entstehung von sekundärer mechanischer Hyperalgesie zu bewerten, wurde die Sensibilität auf taktile Stimulation unter Verwendung eines dynamischen plantaren Ästhesiometers (DPA, Ugo Basile, Comerio, Italien) beurteilt. Dabei handelt es sich im Prinzip um eine automatisierte Version der von Frey Haar-Untersuchung. Plantare von Frey Haare werden unter anderem genutzt, um Veränderungen in der Berührungsempfindung aufgrund von neuronalen Schädigungen (als Reaktion auf mechanische Stimulation) zu erkennen. Anstelle verschiedener Filamente ansteigender Dicke, die unterschiedliche Gewichtskräfte auf die Pfoten ausüben, wird hier ein starres, jedoch stumpfes Filament direkt unter der Sohle der zu testenden Pfote platziert. Anschließend wird das Filament über 20 s mit ansteigender Kraft gegen die Pfote gedrückt, bis die Ratte diese wegzieht oder ein maximales Gewicht von 50 g erreicht wird. Das DPA erfasst dabei automatisch das Gewicht, bei dem die Pfote weggezogen wurde, sowie die Latenz bis zum Wegziehen. Jede Pfote wurde 3 Mal pro Versuchstag getestet.

Die Tiere befanden sich während dieser Testung in einem Plexiglasbehälter mit Drahtgitterboden. Vor Beginn des Tests wurden die Tiere über mindestens 10 Minuten an diese Umgebung akklimatisiert.

3.5.2.3 Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie

Die thermische Hyperalgesie der Hinterpfoten wurde mit einem Algesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italien) gemessen. Dieses Verfahren wurde durch Hargreaves (Hargreaves et al., 1988) erstmals beschrieben. Dabei wurden die Ratten in einen Plexiglasbehälter gesetzt, an den sie vor Beginn der Testung für mindestens 10 Minuten gewöhnt wurden. Danach wurde die Hitzequelle so positioniert, dass der Laserstrahl direkt auf die plantare Fläche der Hinterpfote einwirken konnte. Durch das Wegziehen der Pfote wurde durch Aktivierung eines Lichtschrangenmechanismus die Hitzezufuhr unterbrochen und der Zeitzähler gestoppt. Zur Verhinderung von Gewebsverletzungen wurde eine maximale Messzeit von 20 s definiert. Die Tiere wurden abwechselnd rechts und links jeweils 3 Mal an einem Versuchstag getestet, wobei zwischen den Testungen mindestens 2 Minuten Zeit lagen.

3.6 Gewebeentnahme

Nach dem Töten der Tiere (s.o.) wurden beide Kniegelenke von den anheftenden Muskeln und Geweben frei präpariert, *in toto* entnommen und für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in gepuffertem Formalin (4%) (Ansatz siehe Tabelle 3.8) fixiert.

Des Weiteren wurde den Ratten, wie unter 3.3.2.2 beschrieben, 5 ml Blut entnommen.

Um zu überprüfen, ob durch die Anlage des intrathekalen Katheters eine Myelitis entstanden ist, die möglicherweise die gewonnenen Befunde beeinträchtigen könnte, wurde das Rückenmark entnommen. Dieses wurde durch eine Laminektomie auf der Höhe L1-L4 von dorsal freigelegt und das entnommene Stück ebenfalls für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur in gepuffertem Formalin (4%) (Ansatz siehe Tabelle 3.8) fixiert.

Tabelle 3.8: Ansatz der gepufferten Formalin (4%)-Lösung

Substanz	Hersteller	Konzentration
Formaldehyd (40%)	Sigma	100 ml/l
Dinatriumphosphat, wasserfrei	Sigma	6,5 g/l
Natrium-Monophosphat (Monohydrat)	Sigma	4 g/l
Aqua dest.	Braun	

3.7 Bestimmung der Etanercept-Konzentration im Serum

Wie bereits oben erwähnt, kann bei der spinalen Applikation ein kleiner Teil über die Blut-Hirn-Schranke bzw. in die Peripherie gelangen. Aus diesem Grund wurde die Etanercept-Konzentration im Serum bestimmt. Dafür wurde von der Firma Sanguin Diagnostics, Holland eine ELISA-Bestimmung an 4 Seren durchgeführt.

3.8 Aufarbeitung der Gewebe

3.8.1 Kniegelenke

Nach der Fixierung in gepuffertem Formalin (4%) (siehe 3.6) wurden die Kniegelenke in Aluminiumchlorid ($\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Roth) entkalkt, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 85, 96, 100 %) (Rotisol, Roth) entwässert, und nach Xylol-Behandlung (Fluka) in Paraffin (Histosec, Merck) eingebettet. Es wurden 3 – 4 frontale Schnitte des gesamten Gelenks von 2 μm Dicke mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2045, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Für die lichtmikroskopische Beurteilung wurden die Schnitte in Xylol (Fluka) und der absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 85, 70 und 50 %) (Rotisol, Roth) entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin (Hämatoxylin: Ansatz siehe Tabelle 3.9, Eosin: Sigma) gefärbt.

Tabelle 3.9: Ansatz der Hämatoxylin-Lösung

Substanz	Hersteller	Konzentration
Hämatoxylin-Monohydrat	Merck	1 g/l
Natriumiodat	Merck	0,2 g/l
Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat	Merck	50 g/l
Chloralhydrat	Merck	50 g/l
Citronensäure-Monohydrat	Merck	1 g/l

3.8.2 Rückenmark

Im Anschluss an die Stabilisierung des Rückenmarks in gepuffertem Formalin (4 %) wurde es mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 3 – 4 Schnitte des gesamten Blocks von 7 µm Dicke mittels eines Mikrotoms angefertigt. Für die mikroskopische Beurteilung wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und mittels der Panoptischen Färbung nach Pappenheim (Färbelösungen: May-Grünwald-Lösung: Merck, Giemsa-Lösung: Fluka) angefärbt.

3.9 Histologische Bewertung

3.9.1 Histopathologische Bewertung der Antigen-induzierten Arthritis

Die histologischen Kniegelenksschnitte wurden anhand eines festgelegten Punktesystems von zwei unabhängigen Gutachtern ohne Kenntnis der Tiernummern, der Gruppenzugehörigkeit bzw. der vorgenommenen Experimente beurteilt. Dabei stand einerseits die Bewertung akuter Entzündungsparameter wie Exsudat und granulozytäre Infiltration der Synovialmembran (siehe Tabelle 3.10), andererseits die chronischen Entzündungszeichen wie synoviale Hyperplasie, mononukleäre Infiltration der Synovialmembran sowie der Befall der periartikulären Strukturen (siehe Tabelle 3.11) im Vordergrund. Zudem wurde die Knorpel- (siehe Tabelle 3.12) und Knochendestruktion (siehe Tabelle 3.13) eingeschätzt. Waren im Kniegelenk keine pathologischen Befunde sichtbar, wurde

der Wert Null vergeben. Durch die Bewertung der einzelnen Parameter wurde für die 3 Hauptkriterien jeweils ein Score bestimmt.

Tabelle 3.10: Histologische Kriterien der akuten Entzündung

Bewertung	<i>Exsudat</i>
1	einzelne Granulozyten
2	fleckförmiges Granulozytenexsudat
3	massiv
	<i>granulozytäre Infiltration der Synovialmembran</i>
1	einzelne Granulozyten
2	kleinherdig oder diffus mäßig
3	mittelgradig bis dicht
+ 1	wenn Fibrin deutlich nachweisbar
+ 1	wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen

Tabelle 3.11: Histologische Kriterien der chronischen Entzündung

Bewertung	<i>Synoviale Hyperplasie (Hyperplasie der Deckzellschicht / der lining cells)</i>
1	geringe Hyperplasie, keine Aktivierung der lining cells oder keine Hyperplasie, Aktivierung von mehr als 50 % der lining cells
2	fleckförmige Hyperplasie mit Aktivierung der lining cells
3	deutliche Hyperplasie
	<i>Mononukleäre Infiltration der Synovialmembran</i>
1	einzelne Granulozyten
2	kleinherdig oder diffus mäßig
3	mittelgradig bis dicht
+ 1	wenn Fibrin deutlich nachweisbar
+ 1	wenn periartikuläres Gewebe mit betroffen
	<i>Periartikuläre Strukturen (Fibrose, Infiltration)</i>
1	geringe Fibrose / Infiltration
2	mäßige Fibrose / Infiltration
3	stark fibrös verbreitet / dichte entzündete Infiltration

Tabelle 3.12: Histologische Kriterien der Knorpeldestruktion

<i>Bewertung</i>	<i>Destruktion Knorpel</i>
0,5	< 10 %, fokal
1	10 – 20 %
1,5	20 – 39 %
2	40 – 59 %
2,5	60 – 79 %
3	> 80 %

Prozente (%) beziehen sich auf die beurteilten Knorpelstrukturen im HE-Schnitt.

Tabelle 3.13: Histologische Kriterien der Knochendestruktion

<i>Bewertung</i>	<i>Destruktion Knochen</i>
0,5	< 10 %, fokal
1	10 – 20 %
1,5	20 – 39 %
2	40 – 59 %
2,5	60 – 79 %
3	> 80 %

Prozente (%) beziehen sich auf die beurteilten Knochenstrukturen im HE-Schnitt.

3.9.2 Histologische Bewertung des Rückenmarks

Die Beurteilung der histologischen Rückenmarksschnitte wurde von einem Gutachter ohne Kenntnis der Tiernummer und Gruppenzugehörigkeit vorgenommen. Dabei wurde der Leukozytenbefall des Rückenmarks zur Bewertung in drei Gruppen unterteilt: 1: kein Befall, 2: randständiger Befall und 3: Einbruch in das Rückenmark und dementsprechend das Vorhandensein einer Myelitis. Tiere bei denen ein Einbruch in das Rückenmark zu beobachten war, wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen.

3.10 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, www.spss.com) für Windows, Version 14.0. Zunächst wurden alle Daten mittels Kolmogoroff-Smirnoff-Test auf Normalverteilung überprüft. Anschließend wurden Mittelwerte, Standardabweichungen (standard deviation, S.D.) und Standardfehler (standard error of mean, S.E.M.) mittels deskriptiver Statistik berechnet.

Zur Bestimmung der Gruppenunterschiede zwischen Ketamin- und Sham-Behandlung im Akutversuch mit narkotisierten Tieren (Protokoll 1, siehe 3.3.2) wurden ungepaarte, zweiseitige t-Tests angewandt. Da mehrere Parameter verglichen wurden, wurden die errechneten p-Werte nach Bonferroni und Holm korrigiert.

Zur Untersuchung von Gruppenunterschieden in den Versuchen mit kontinuierlicher Langzeitapplikation von Ketamin, Etanercept oder Morphin (Protokoll 2, siehe 3.3.3) wurden Messwiederholungs-ANOVAs (Analysis Of Variance) verwendet. Dabei wurde jeweils nur eine Behandlungsgruppe mit der Kontrollbedingung (Sham) verglichen, da ein Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungs-Substanzen nicht beabsichtigt war. Somit dienten die unbehandelten Tiere als Kontrolle für alle verwendeten Substanzen, so dass die Einzelparameter jeweils mit den in diesen Tieren erhobenen Daten verglichen wurden. Auf diese Weise wurden der Zwischen-Subjekt-Faktor „Gruppe“ (jeweilige Behandlung gegen Sham) und der Inner-Subjekt-Faktor „Zeit“ (Vortestung, Testung an Tag 1, 3, 7, 14 und 21 nach Auslösung der AIA) definiert. Zur Beschreibung der Daten wurden anschließend zweiseitige post-hoc t-Tests für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Generell wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung einer wirksamen Ketamindosis

4.1.1 Auslösung der Arthritis

Um eine effektive antinozizeptive Ketamindosis zu ermitteln, wurde bei vier Ratten eine akute Monoarthritis durch die Injektion von Kaolin und Caarageenan in die linken Knie ausgelöst. Alle Tiere entwickelten die klinischen Zeichen einer Arthritis wie Schwellung der linken Kniegelenke und das Einnehmen einer Schonhaltung. Sie wiesen eine deutliche Zunahme der Kniegelenksumfänge nach der Auslösung der Entzündung auf, die im Mittel $2,7 \pm 0,4$ mm betrug.

4.1.2 Intrathekale Ketaminapplikation

Nach der Auslösung einer akuten Monoarthritis im linken Kniegelenk wurde den Tieren in einem ansteigenden Dosierungsmodell jeweils 10 µl Ketaminlösung in den Konzentration 0,125 mg/ml, 1,2 mg/ml, 3,6 mg/ml, 7,2 mg/ml, 20 mg/ml sowie 50 mg/ml intrathekal verabreicht. Da sofort nach der Applikation von 50 mg/ml eine deutliche Parese an beiden Hinterpfoten entstand, die sich nach 30 Minuten wieder zurückgebildet hatte, wurde auf höhere Dosierungen verzichtet.

4.1.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich der primären mechanischen Hyperalgesie

Bei der ansteigenden Druckapplikation auf die linken Kniegelenke mit Hilfe eines Dynamometers zeigte sich nach der Gabe von Ketamin mit den Konzentrationen 0,125, 1,2 und 3,6 mg/ml keine Veränderung in Bezug auf die Testung ohne Ketaminapplikation. Bei der Konzentration von 7,2 mg/ml war ein leichter und bei 20 und 50 mg/ml ein deutlicher antinozizeptiver Effekt zu erkennen. Wie in Abbildung 4.1A gezeigt, waren die Schwellen ähnlich derer vor Arthritisauslösung. Dieser analgetische Effekt kann in Prozent angegeben werden, wobei 0 % kein analgetischer Effekt bedeutet und 100 % einem Zustand wie vor der Arthritisauslösung entspricht. Die dadurch entstehende Dosis-Wirkungs-

Beziehung ist in Abbildung 4.1B dargestellt und zeigt eine nahezu vollständige Normalisierung bei den beiden höchsten Konzentrationen. Normalisierung bedeutet, dass beim Erlangen von 100 % genauso viel Druck auf die entzündeten Knie appliziert werden kann, bis die Ratten sie wegziehen bzw. vokalisieren, wie bei gesunden Ratten.

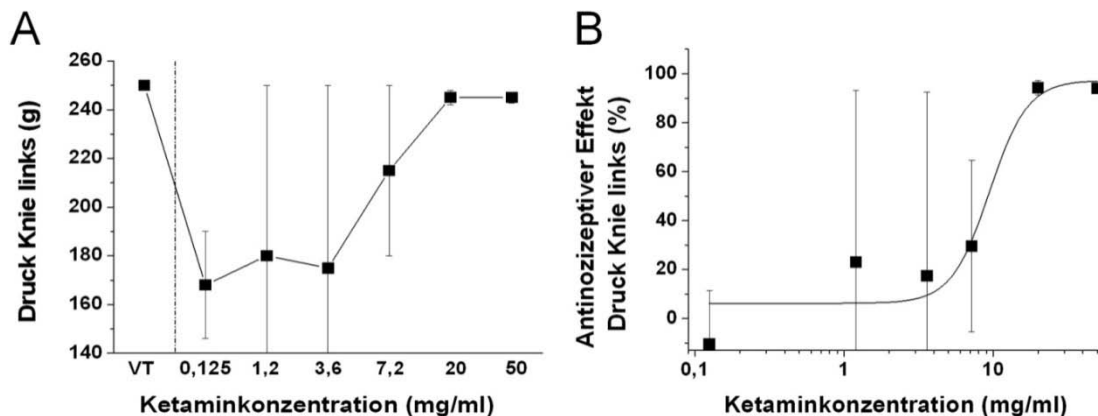


Abbildung 4.1: A Mechanische Schwellen beim Druck auf die entzündeten Kniegelenke in Abhängigkeit der intrathekal applizierten Ketamindosis. B Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen ansteigender Ketamindosis und antinozizeptivem Effekt. n=4. Mittelwerte \pm SEM. VT – Vortestung (keine Entzündung, keine Therapie).

4.1.4 Dosis-Wirkungs-Beziehung hinsichtlich des statischen motorischen Verhaltens

Das statische motorische Verhalten wurde mit Hilfe des Incapacitance-Testers bestimmt, mit dem die Verteilung des Körpergewichts auf die Hinterpfoten gemessen wurde. Eine Normalisierung der Gewichtsverteilung konnte lediglich bei Dosierungen von 20 und 50 mg/ml registriert werden (siehe Abbildung 4.2 A). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve, die die Normalisierung in % angibt, in Abbildung 4.2 B wider.

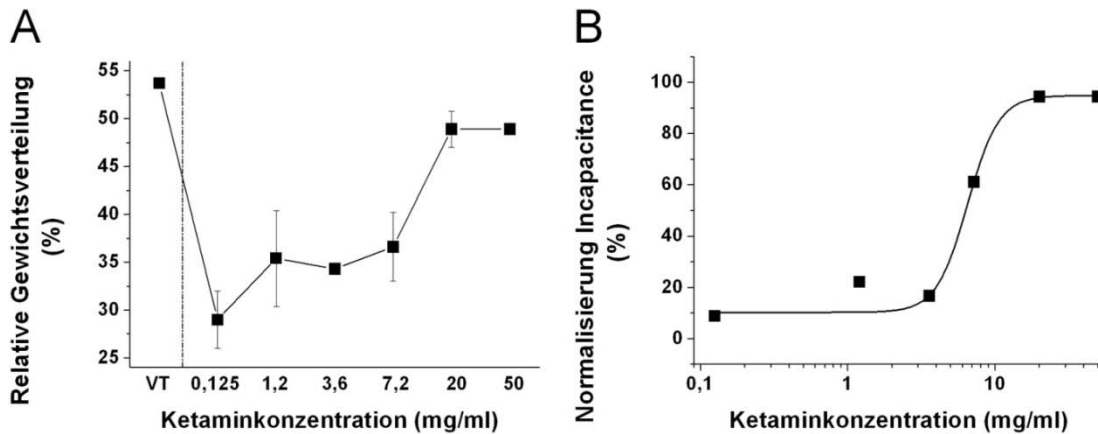


Abbildung 4.2: A Prozentuale Gewichtsverteilung auf die linken entzündeten Hinterpfoten in Abhängigkeit der intrathekal applizierten Ketamindosis. B Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen ansteigender Ketamindosis und dem Normalisierungsgrad der Körpergewichtsverteilung auf die Hinterpfoten. Normalisierung von 100% entspricht Zustand vor Arthritis. n=4. Mittelwerte \pm SEM. VT – Vortestung (keine Entzündung, keine Therapie).

4.1.4 Wahl der Dosierung

Da sich bei einer Dosis von 20 mg/ml Ketamin ein deutlicher Effekt sowohl bei der Testung der primären mechanischen Hyperalgesie sowie bei der des statischen motorischen Verhaltens zeigte, und die Applikation von 50 mg/ml bereits eine beträchtliche Parese der beiden Hinterpfoten mit sich zog, entschieden wir uns, für die weiteren Experimente eine Ketamindosis von 20 mg/ml zu verwenden.

4.2 Rückenmarksnahe Substanzapplikation am narkotisierten Tier (Protokoll I)

4.2.1 Auslösung der Arthritis

Damit die Wirkung von zentralen NMDA-Rezeptor-Antagonisten auf eine akute Kniegelenksentzündung ermittelt werden konnte, wurde bei 24 bereits zweimal immunisierten Ratten eine AIA ausgelöst. Alle Ratten wiesen die bereits unter 4.1.1 erwähnten, typischen Merkmale einer Gelenksentzündung auf.

4.2.2 Ausprägung der Kniegelenksschwellung

Für die Bestimmung der prozentualen Zunahme der Knieumfänge wurde der Durchmesser der Kniegelenke sowohl vor der Auslösung der AIA als auch nach dem Versuchsende gemessen. Dabei zeigten die Ratten, die Ketamin auf das Rückenmark appliziert bekamen, eine signifikant kleinere Umfangszunahme im Vergleich zu den Ratten, die Tyrode auf das Rückenmark appliziert bekamen (siehe Abbildung 4.3).

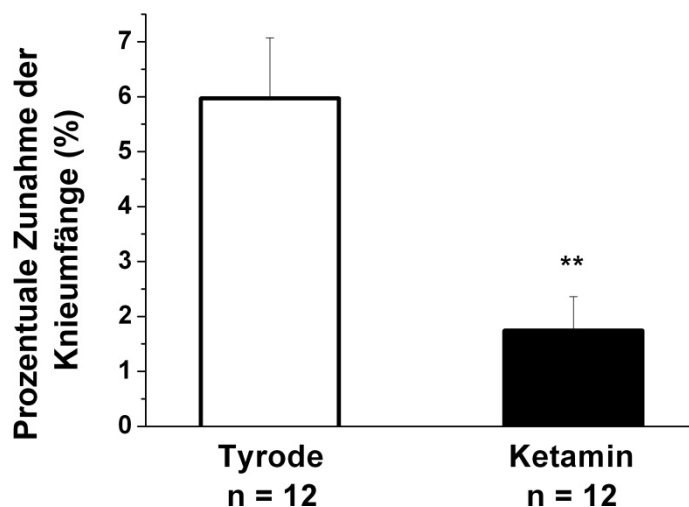


Abbildung 4.3: Prozentuale Zunahme der Kniegelenkssumfänge. Mittelwert \pm SEM. ** = Signifikanzniveau $< 0,01$

4.2.3 Histologie der Kniegelenke

Von 24 Tieren wurden die Kniegelenke wie unter 3.6 beschrieben entnommen und präpariert.

Da es sich hier nur um ein Akutmodell handelt und den Tieren am Tag der Arthritisauslösung die Kniegelenke entnommen wurden, wurde nur die Ausprägung akuter Entzündungszeichen beurteilt. Zu diesen Zeichen gehören zum einen die Ausprägung der granulozytären Infiltration der Synovialmembran sowie zum anderen die Menge des Exsudats. Wie in der Abbildung 4.4 zu erkennen ist, wiesen die Tiere, die Ketamin appliziert bekamen, zwar eine geringere Ausprägung der akuten Entzündungszeichen auf, jedoch unterschied sich diese nicht signifikant von der der Kontrolltiere, die Tyrode verabreicht bekamen.

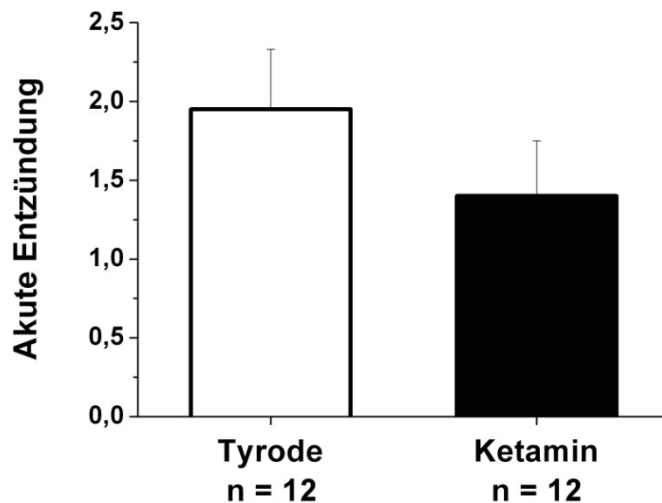


Abbildung 4.4: Ausprägung der histopathologischen akuten Entzündungszeichen in den linken (entzündeten) Kniegelenken. Mittelwert \pm SEM.

4.2.4 Bestimmung der Ketamindosis in der Peripherie

Die Ketamin-Konzentration wurde in den Seren von 17 Ratten bestimmt. Der Mittelwert lag diesbezüglich bei ca. 2,05 ng/ml (bzw. 12,2 nMol). Bezogen auf eine Serummenge von 4 ml entspricht dies ungefähr 8,2 ng Ketamin im Serum. Bei einer spinal verabreichten Konzentration von 20 mg/ml, was bei einer Gesamtapplikation von 700 μ l 14 mg Ketamin entspricht, betrug die in der Peripherie ermittelte Menge somit den 10^{-6} -ten Anteil der ursprünglich verabreichten Substanz. Selbst wenn bei der Betrachtung das Körperwasser von ca. 120 ml berücksichtigt würde, würde die gemessene Konzentration ca. 246 ng betragen, was ebenfalls nur einen Bruchteil der Ausgangskonzentration ausmacht.

4.3 Kontinuierliche intrathekale Substanzapplikation am wachen Tier (Protokoll II)

Für die Versuche des Protokolls II wurde bei insgesamt 48 bereits zweimal immunisierten Ratten eine Antigen-induzierte Arthritis ausgelöst. Bis auf ein Tier, das aus der Beurteilung genommen wurde, wiesen alle die bereits oben erwähnten typischen Merkmale einer Gelenkentzündung auf. Die übrigen 47 Ratten waren wie folgt in 4 Gruppen aufgeteilt: Ketamin-behandelte Ratten (n=16), Etanercept-behandelte Ratten (n=8), Morphin-behandelte Ratten (n=8) und unbehandelte, entzündete Kontrolltiere (Sham) (n=15) als Vergleichspopulation.

Während der akuten Phase der Entzündung zeigte sich zwischen den Tagen 1 und 3 nach der Auslösung der Kniegelenksentzündung bei allen vier Gruppen eine Stagnation der Gewichtszunahme. Ab Tag 3 war bei den Ketamin-behandelten sowie bei den Sham-Tieren eine stetige Gewichtszunahme zu erkennen, wohingegen bei den Ratten, die Etanercept verabreicht bekamen, der Stillstand überdies bis Tag 7 anhielt und erst dann eine Steigerung des Gewichts zu sehen war. Die Ratten, denen Morphin appliziert wurde, nahmen zwischen Tag 3 und 7 sogar an Körpergewicht ab, zeigten dann aber, ebenso wie die anderen Gruppen, eine kontinuierliche Gewichtserhöhung.

4.3.1 Intrathekale Applikation von Ketamin

Für die Versuche wurden insgesamt 16 Ratten verwendet. Da an Tag 3 nach Auslösung der AIA bei 8 Tieren eine Dislokation der Pumpe vom Katheter festgestellt wurde, wurden diese Tiere aus dem Versuch genommen. Daraus ergibt sich eine Tierzahl von n=16 bis Tag 3, und von n=8 ab Tag 7. Bei den restlichen Tieren waren während des gesamten Untersuchungszeitraums keine Auffälligkeiten zu beobachten. Die Pumpen waren am Ende des Versuchs intakt und mit dem Katheter verbunden.

4.3.1.1 Schwere der Entzündung

4.3.1.1.1 Schwellung

Die Gelenkschwellungen erreichten sowohl bei den Ketamin-behandelten Ratten wie auch bei unbehandelten Kontrolltieren an den Tagen 1 und 3 ihr Maximum, wobei die Ketamin-behandelten Ratten ab Tag 3 einen deutlich schnelleren Rückgang der Schwellung im Bezug auf die Kontrolltiere aufwiesen, der jedoch statistisch nicht signifikant war. (Abb. 4.5)

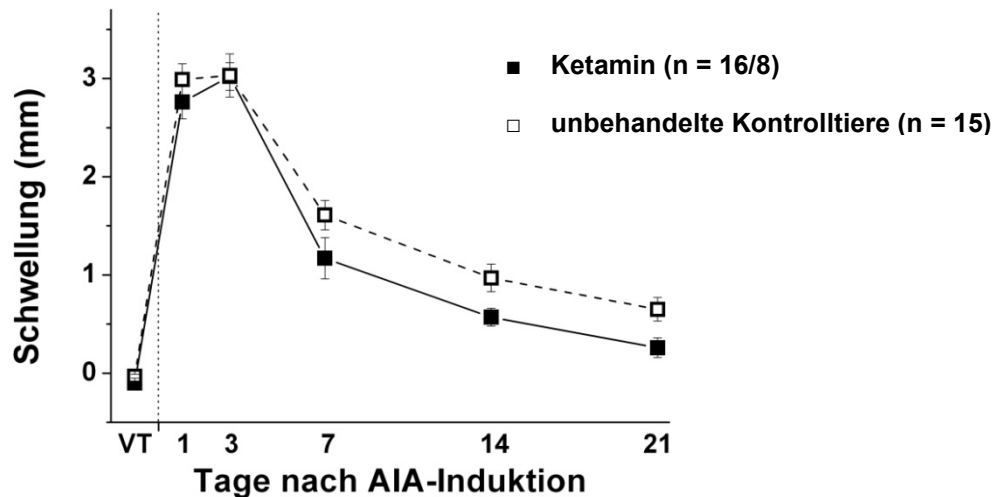


Abbildung 4.5: Differenz der Kniegelenksdurchmesser (links – rechts) der Ketamin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: ■ Ketamin (n = 16/8, siehe Text) □ unbehandelte Kontrolltiere (n = 15). VT – Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). Mittelwerte \pm SEM.

4.3.1.1.2 Histologie der Kniegelenke

Wie man in Abbildung 4.6 A erkennen kann, waren im Gegensatz zu den unbehandelten und entzündeten Kontrolltieren bei den Ketamin-behandelten Tieren an Tag 21 keine Zeichen einer akuten Entzündung mehr zu erkennen.

Die chronischen Entzündungszeichen waren bei den behandelten Tieren signifikant geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrolltieren (Abb. 4.6B)

Die Zeichen der Destruktion waren bei den Tieren, die Ketamin appliziert bekamen, deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrollen. (Abbildung 4.6C) Dieser Unterschied war mit $p = 0,059$ gerade nicht signifikant.

In den Abbildungen 4.7C und D kann man diesen histomorphologischen Unterschied zwischen den Ketamin-behandelten Ratten und den unbehandelten Kontrollen (Abb. 4.7 A und B) deutlich erkennen.

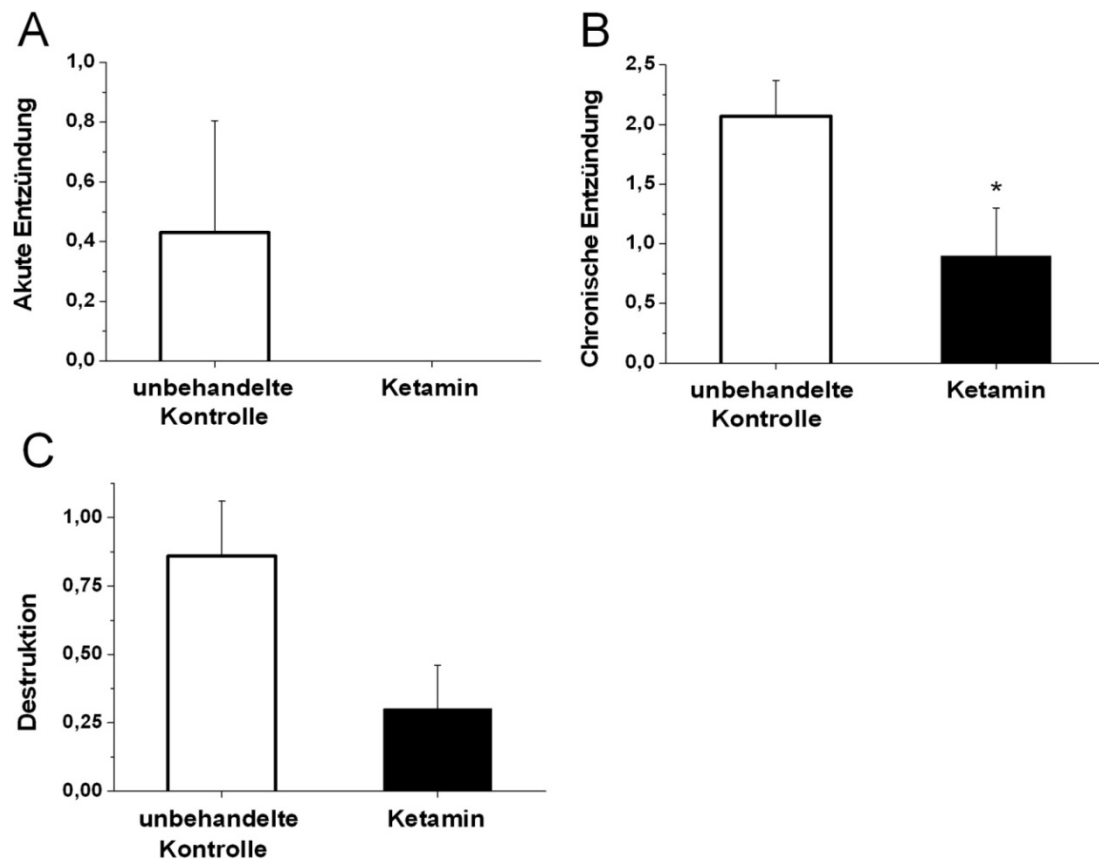


Abbildung 4.6: Ausprägung der akuten (A) und chronischen Entzündungszeichen (B) sowie der Knorpel- und Knochendestruktion (C) an Tag 21 nach Entzündungsinduktion bei Ketamin-behandelten Tieren ($n = 16/8$ siehe Text) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($n = 15$). * - Signifikanzniveau $< 0,05$. Mittelwerte \pm SEM.

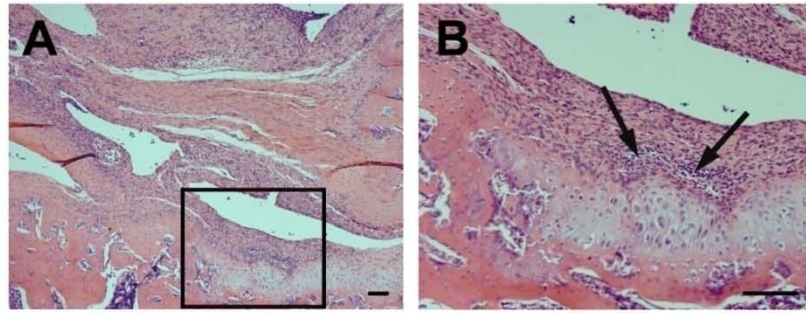
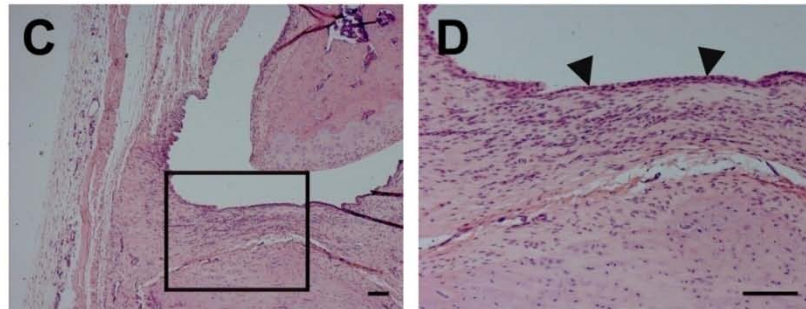
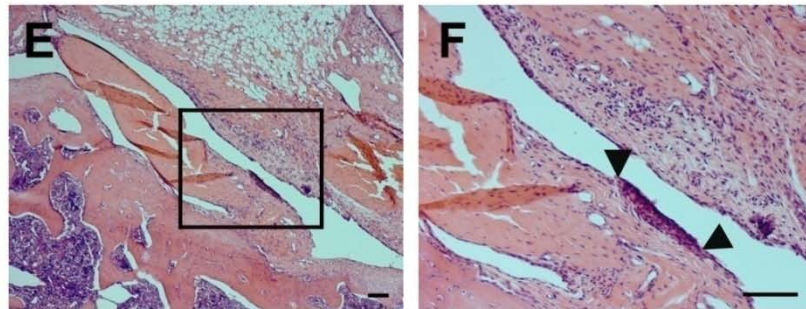
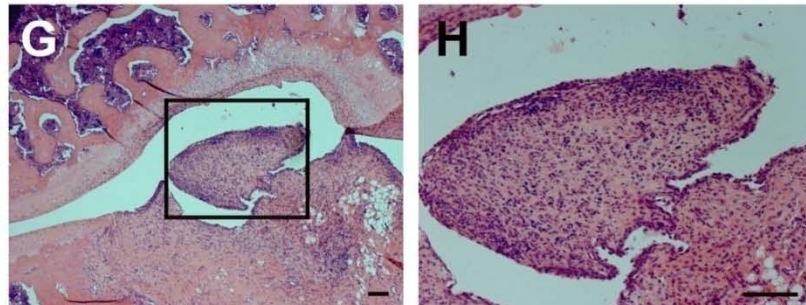
Unbehandelte Kontrolle**Ketamin****Etanercept****Morphin**

Abbildung 4.7: Repräsentative Ausschnitte von HE gefärbten Kniegelenken un behandelter Kontrolltiere (A, B) und von Tieren behandelt mit Ketamin (C, D), Etanercept (E, F) oder Morphin (G, H). Die in A, C, E und G markierten Ausschnitte sind in höherer Vergrößerung in B, D, F und H dargestellt. Pfeile in B: tiefe Infiltration von Entzündungszellen mit Knorpeldestruktion. Pfeilspitzen in D und F: oberflächliche synoviale Infiltration von Entzündungszellen. Die Balken entsprechen 100 µm.

4.3.1.2 Motorische Verhaltenstests

4.3.1.2.1 Dynamische Testung

Bei den links-rechts-Abständen der Hinterpfoten war bei den Ketamin-behandelten Ratten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine signifikant geringere

Verkürzung zu erkennen als bei den unbehandelten Kontrolltieren, wie man in Abbildung 4.8 A sehen kann [$F(3,4) = 7,747$; $p < 0,05$].

Die Ausprägung der Außenrotation der Hinterpfoten (Winkel) war bei den Tieren, die Ketamin appliziert bekamen, signifikant geringer [$F(1,6) = 16,581$; $p < 0,001$] (Abb. 4.8 B). Dieser Parameter unterschied sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von den unbehandelten Kontrollen.

Bei der Breite zwischen den Abdrücken der beiden Hinterpfoten war in der Akutphase kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen. Man konnte eine deutliche Verbreiterung des Ganges von 2,6 cm bei der Vortestung auf 3,6 cm an Tag 3 beobachten. Jedoch war zwischen den Tagen 3 und 7 eine deutliche Verschmälerung des Ganges bei den Ketamin-behandelten Tieren zu erkennen (von 3,6 cm auf 2,9 cm). Während des weiteren Verlaufs blieben die Werte der Ketamin-behandelten Tiere konstant. Bei den Kontrolltieren zeigte sich nur eine geringe Veränderung der Werte von 3,6 cm auf 3,3 cm am Tag 21.

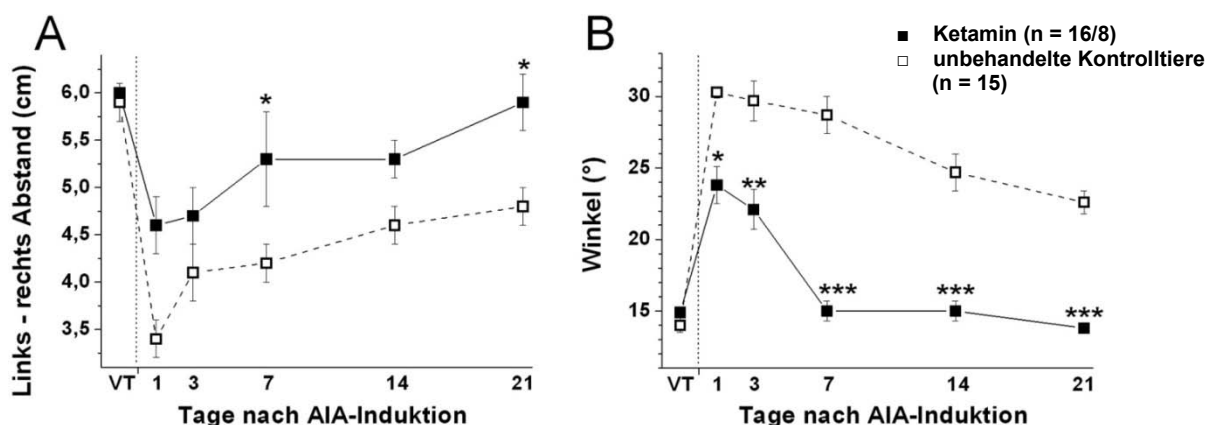


Abbildung 4.8: Links-rechts Abstände (A) und Rotationswinkel (B) zwischen den Pfotenabdrücken der Ketamin-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.5. * = $< 0,05$; ** = $< 0,01$; *** = $< 0,001$.

4.3.1.2.2 Statische Testung

Mit Hilfe des Incapacitance-Testers wurde die Verteilung des Körpergewichts der Ratten auf ihre beiden Hinterpfoten ermittelt. Wie in Abbildung 4.9 zu erkennen ist, zeigte sich in der Akutphase sowohl bei den Ketamin-behandelten Tieren sowie bei den unbehandelten Kontrollen eine deutliche Verlagerung der Körpergewichte auf die rechte, nicht-entzündete Seite. Ab Tag 7 stellte sich bei den Ratten, die

Ketamin verabreicht bekamen, eine Gleichverteilung des Gewichts auf die Hinterpfoten ein, die sich signifikant bis Tag 21 von den unbehandelten Kontrolltieren unterschied [$F(1,7) = 10,311$; $p < 0,05$].

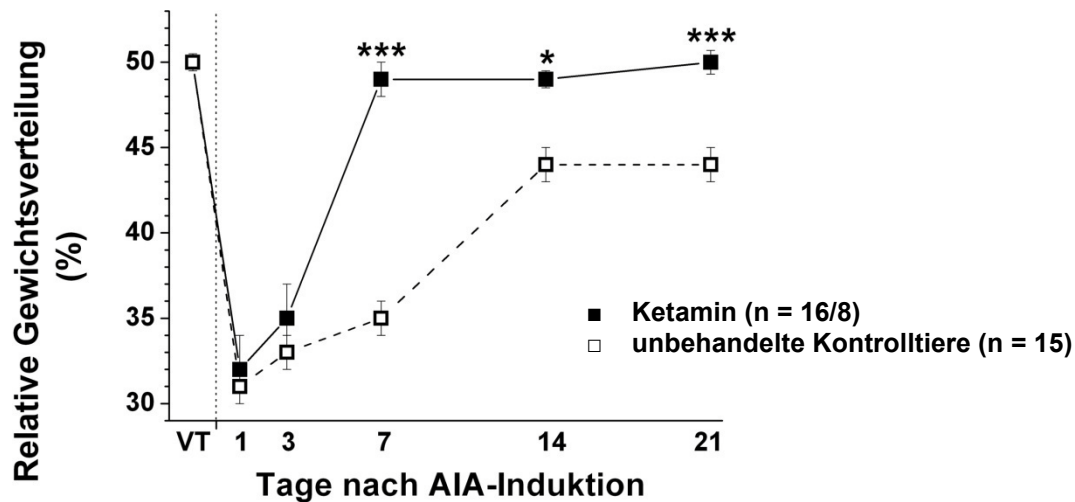


Abbildung 4.9: Relative Gewichtsverlagerung auf die linken hinteren Extremitäten der Ketamin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.5. * = $< 0,05$; *** = $< 0,001$.

4.3.1.3 Schmerzassoziierte Verhaltenstests

4.3.1.3.1 Messung der primär mechanischen Hyperalgesie

Wie in Abbildung 4.10 A gezeigt, wiesen die Ketamin-behandelten Tiere während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant geringere Wegzugsschwellen als die unbehandelten Kontrolltiere auf der linken Seite auf [$F(1,7) = 16,581$; $p < 0,01$]. Diese waren insbesondere an den Tagen 1, 7 und 14 signifikant verschieden von den unbehandelten Kontrolltieren. In Abbildung 4.10 B kann man sehen, dass bei beiden Gruppen die mechanischen Schmerzschwellen der Kniegelenke auf der gesunden rechten Seite während der Akutphase viel geringer ausgeprägt waren als auf der entzündeten linken Seite. Ebenso kann man erkennen, dass beim Übergang in die chronische Phase die mechanischen Schmerzschwellen der Kniegelenke sowohl auf der linken wie auf der rechten Seite auf das Niveau vor der Entzündungsauslösung zurückgingen. Die mechanischen Schmerzschwellen der rechten, also kontralateralen, nicht-

entzündeten Kniegelenke der Ketamin-behandelten Ratten unterschieden sich signifikant von denen der unbehandelten Kontrollen [$F(1,7) = 6,388$; $p < 0,05$].

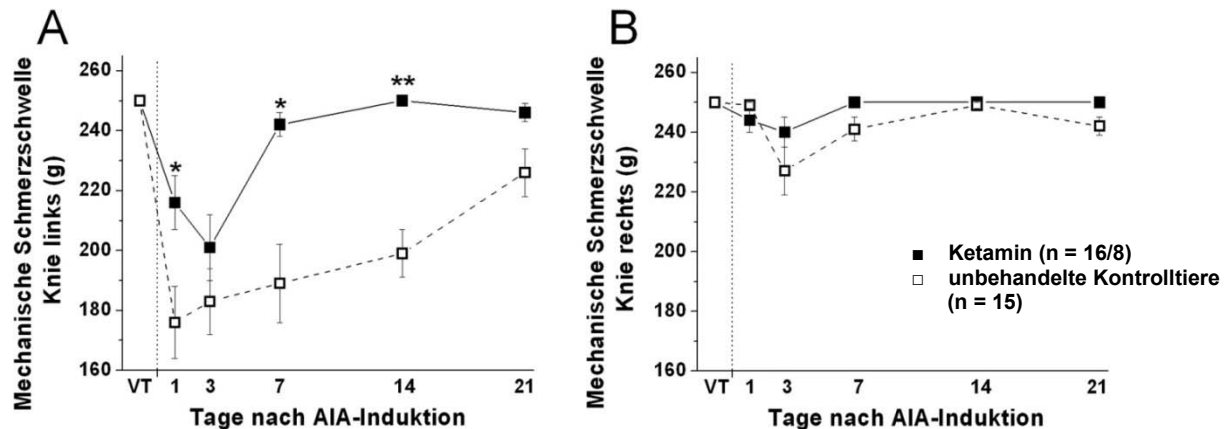


Abbildung 4.10: Mechanische Schmerzschwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Kniegelenke der Ketamin-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.5. * = $< 0,05$; ** = $< 0,01$.

4.3.1.3.2 Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie

Während des gesamten Zeitraums war kein Unterschied der Wegzugslatenzen der linken Hinterpfoten zwischen den Ketamin-behandelten Ratten und den unbehandelten Kontrolltieren zu erkennen. Bei beiden Gruppen konnte man in der Akutphase eine deutliche Verringerung der Wegzugsschwellen der Hinterpfoten sehen. Während die Ketamin-behandelten Ratten ihre linken Pfoten bei der Vortestung erst nach $9,55 \pm 1,98$ s wegzogen, taten sie es am Test-Tag 1 schon nach $5,48 \pm 2,1$ s. Bei den unbehandelten Kontrollen war ein ähnliches Bild zu beobachten. Beim Übergang in die chronische Phase veränderten sich diese Werte nur minimal.

4.3.1.3.3 Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie

Abbildung 4.11 zeigt bei den Ketamin-behandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum, ausgenommen Tag 7, höhere Wegzugslatenzen der linken Hinterpfoten als bei den unbehandelten Kontrollen [$F(1,7) = 6,154$; $p < 0,05$].

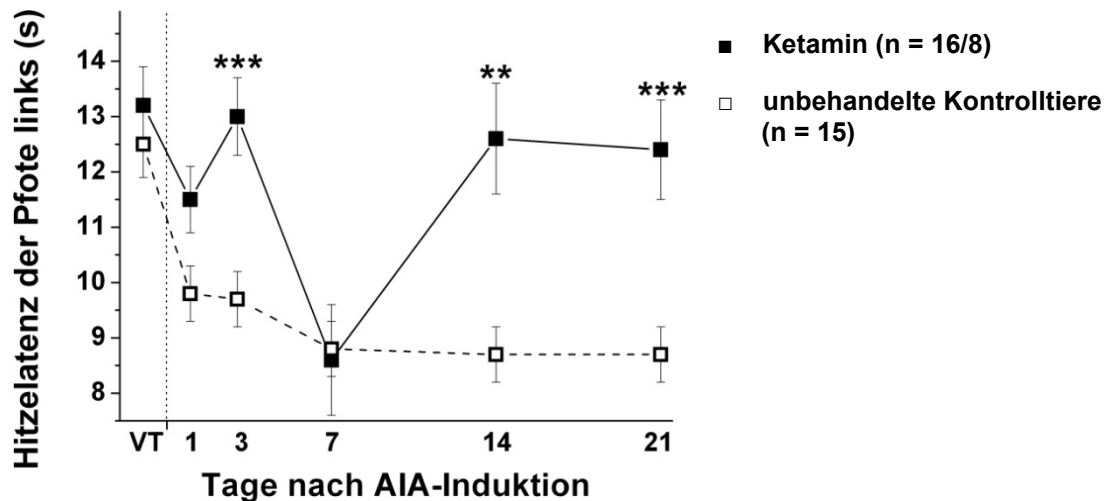


Abbildung 4.11: Hitzeleatenzen an den linken Hinterpfoten von Ketamin-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.5. ** = < 0,01; *** = < 0,001.

4.3.2 Intrathekale Applikation von Etanercept

Es wurden für die Versuche 8 Ratten verwendet, die Etanercept intrathekal appliziert bekamen. Sie zeigten zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen Auffälligkeiten in ihrem Verhalten.

4.3.2.1 Schwere der Entzündung

4.3.2.1.1 Schwellung

Auch bei den Etanercept-behandelten Tieren war ein Maximum der Gelenkschwellungen an den Tagen 1 und 3 nach der Entzündungsauslösung zu erkennen, wobei die Gelenkschwellungen eine deutlich geringere Ausprägung sowie eine signifikant schnellere Rückbildung aufwiesen als in den entsprechenden Kontrollen [$F(1,6) = 13,919$; $p = 0,01$] (Abbildung 4.12).

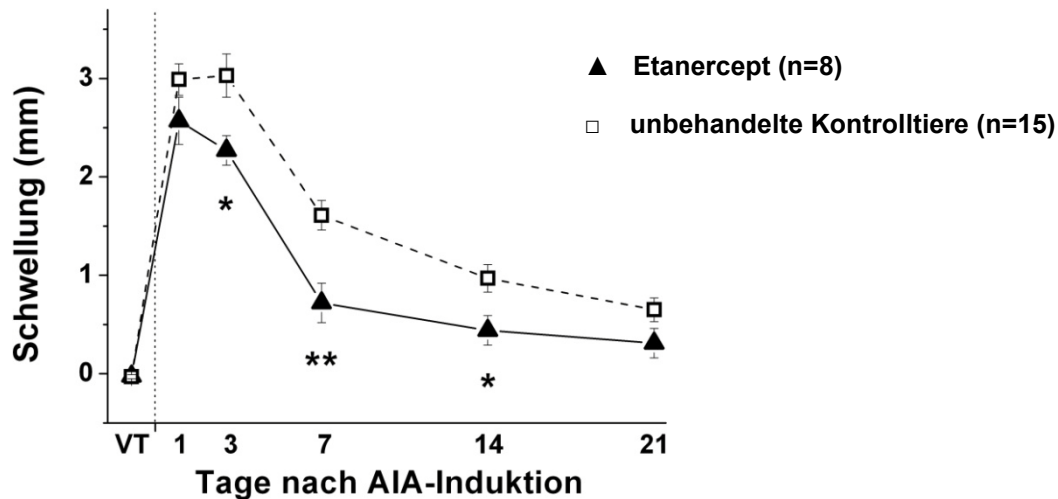


Abbildung 4.12: Differenz der Kniegelenksdurchmesser (links – rechts) der Etanercept-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: ▲ Etanercept (n = 8). □ unbehandelte Kontrolltiere (n = 15). * = < 0,05; ** = < 0,01. VT – Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). Mittelwerte ± SEM.

4.3.2.1.2 Histologie der Kniegelenke

Histopathologische Zeichen der akuten Entzündung waren bei den Etanercept-behandelten Ratten noch an Tag 21 zu erkennen und unterscheiden sich nur gering von den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 4.13A).

Hingegen waren die chronischen Entzündungszeichen bei den behandelten Tieren signifikant geringer ausgeprägt als bei den Sham-Tieren (Abbildung 4.13B). Ebenso zeigte sich eine deutliche Verringerung der histopathologischen Destruktionszeichen unter intrathekalen Etanercept-Therapie (Abbildung 4.13C).

In den Abbildungen 4.7 E und F ist das histomorphologische Korrelat dazu abgebildet.

Abbildung 4.13: Ausprägung der akuten (A) und chronischen Entzündungszeichen (B) sowie der Knorpel- und Knochendestruktion (C) nach Entzündungsinduktion bei Etanercept-behandelten Tieren (n=8) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n=15). * - Signifikanzniveau <0,05. ** - Signifikanzniveau < 0,01. Mittelwerte \pm SEM.

4.3.2.2 Motorische Verhaltenstests

4.3.2.2.1 Dynamische Testung

Die in Abbildung 4.14 A dargestellten links-rechts Abstände der Pfotenabdrücke zeigten bei den Etanercept-behandelten Ratten eine geringere Verkürzung als bei den unbehandelten Kontrollen, jedoch war dieser Unterschied über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant.

Die Breite der Pfotenabdrücke war unter Etanercept-Therapie nicht verschieden von der Kontrollgruppe. An Tag 1 konnte eine Verbreiterung des Ganges auf ca. 3,5 cm (von 2,6 cm bei der Vortestung) bei beiden Gruppen beobachtet werden. Während des Arthritisverlaufs war nur eine geringe Verschmälerung zu erkennen. Der Mittelwert der behandelten sowie der Kontrolltiere betrug an Tag 21 3,3 cm.

Wie man in Abbildung 4.14 B erkennen kann, ist die Außenrotation der Hinterpfoten (Winkel) bei den Etanercept-behandelten Tieren während der Akutphase deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrollen.

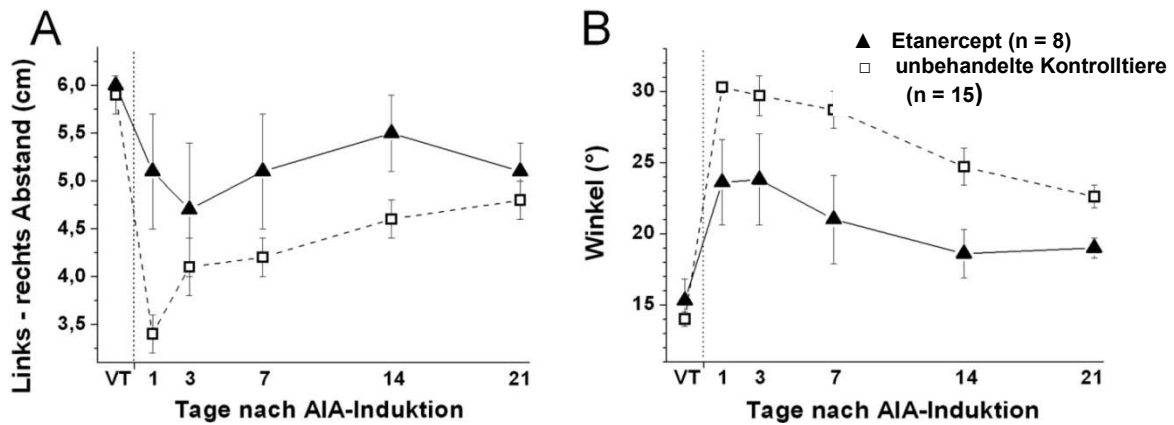


Abbildung 4.14: Links-rechts Abstände (A) und Rotationswinkel (B) zwischen den Pfotenabdrücken der Etanercept-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.12.

4.3.2.2.2 Statistische Testung

Wie in Abbildung 4.15 gezeigt, waren die Gewichtsverlagerungen auf die Hinterpfoten bei den Etanercept-behandelten Ratten mit Ausnahme von Tag 14 immer signifikant verschieden von den unbehandelten Kontrolltieren [$F(1,5) = 12,753$; $p < 0,05$]. Selbst in der Akutphase konnten deutlich geringere Gewichtsverlagerungen auf die rechte gesunde Seite bei den behandelten Tieren beobachtet werden.

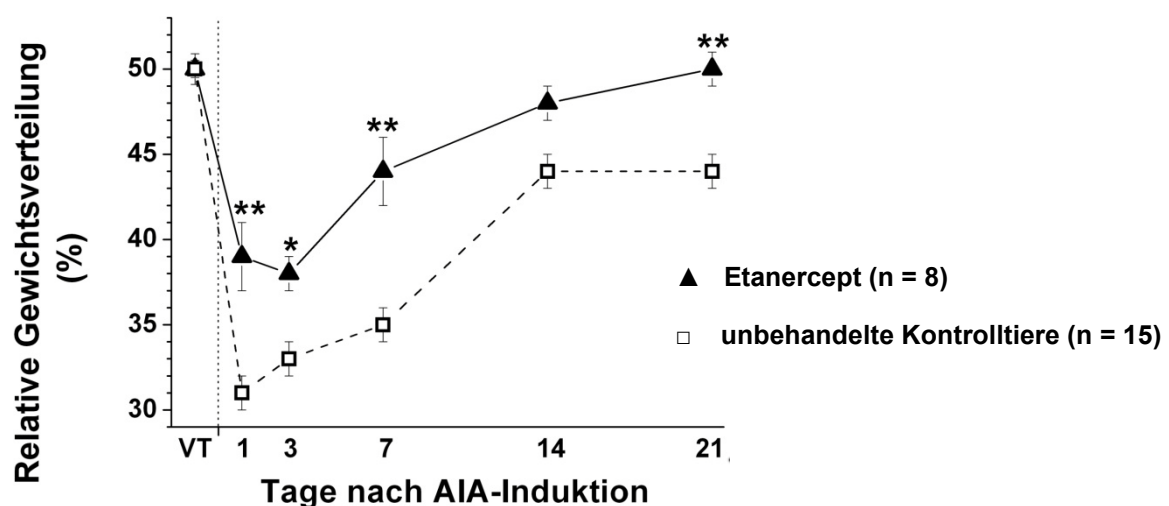


Abbildung 4.15: Relative Gewichtsverlagerungen auf die linken hinteren Extremitäten der Etanercept-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abbildung 4.12.

4.3.2.3 Schmerzassoziierte Verhaltenstests

4.3.2.3.1 Messung der primär mechanischen Hyperalgesie

Wie in Abbildung 4.16 A dargestellt, waren die mechanische Schmerzschwellen der linken Kniegelenke während des gesamten Untersuchungszeitraumes bei den Etanercept-behandelten Ratten nicht so stark herabgesetzt wie bei den unbehandelten Kontrolltieren [$F(1,6) = 17,230$; $p < 0,01$]. Es konnte beobachtet werden, dass selbst an Tag 1 der Akutphase ein markanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. An den Tagen 3, 7 und 14 war die Ausprägung der primären mechanischen Hyperalgesie signifikant verschieden von den Kontrollen. Bei der Betrachtung der mechanischen Schwellen an den rechten Kniegelenken in Abbildung 4.16 B kann man bei beiden Gruppen eine viel geringere Herabsetzung in der Akutphase als auf der linken Seite erkennen.

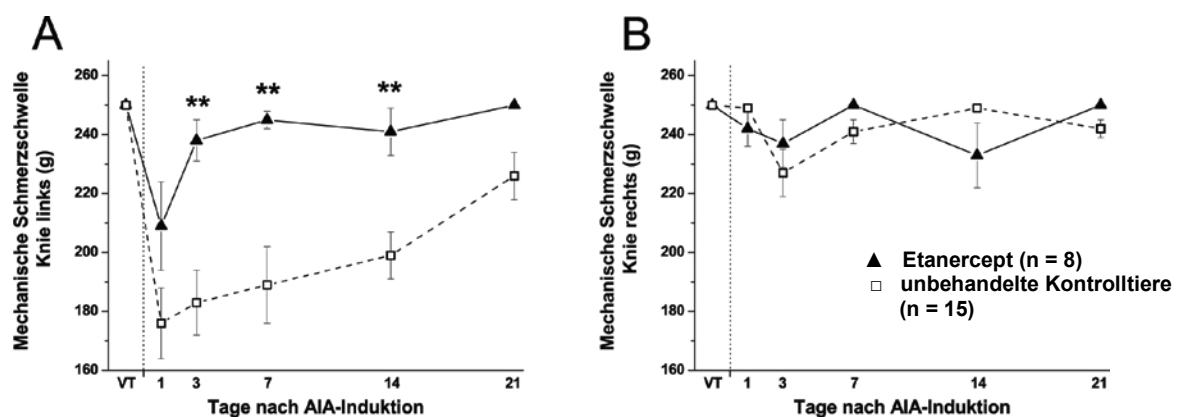


Abbildung 4.16: Mechanische Schmerzschwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Kniegelenke der Etanercept-behandelten Ratten in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abbildung 4.12.

4.3.2.3.2 Messung der sekundär mechanischen Hyperalgesie

Die Wegzugslatenzen der linken Hinterpfoten betrugen vor der Entzündungsauslösung bei den Etanercept-behandelten Ratten $9,0 \pm 2,2$ s und bei den unbehandelten Kontrolltieren $8,8 \pm 2,7$ s. In der Akutphase sanken die Werte bei den behandelten Tieren auf $5,5 \pm 1,3$ s an Tag 1 und $5,6 \pm 0,9$ s an Tag 3 ab; bei den Kontrollen waren es $5,1 \pm 2$ s an Tag 1 und $4,9 \pm 1,8$ s an Tag 3. An Tag 7 erhöhten sich die Wegzugs-Schwellen bei den behandelten Ratten auf $7,0 \pm$

2,1 s, während sie bei den Kontrollen $4,9 \pm 2,3$ s betrugen; jedoch näherten sie sich dann im weiteren Verlauf wieder einander an. Insgesamt waren diese Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant.

4.3.2.3.3 Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie

Auch die Etanercept-behandelten Ratten wiesen über den gesamten Zeitverlauf eine Abnahme der Latenzen auf, wie in Abbildung 4.17 zu erkennen ist. Ein signifikanter Gruppenunterschied war jedoch nicht nachweisbar.

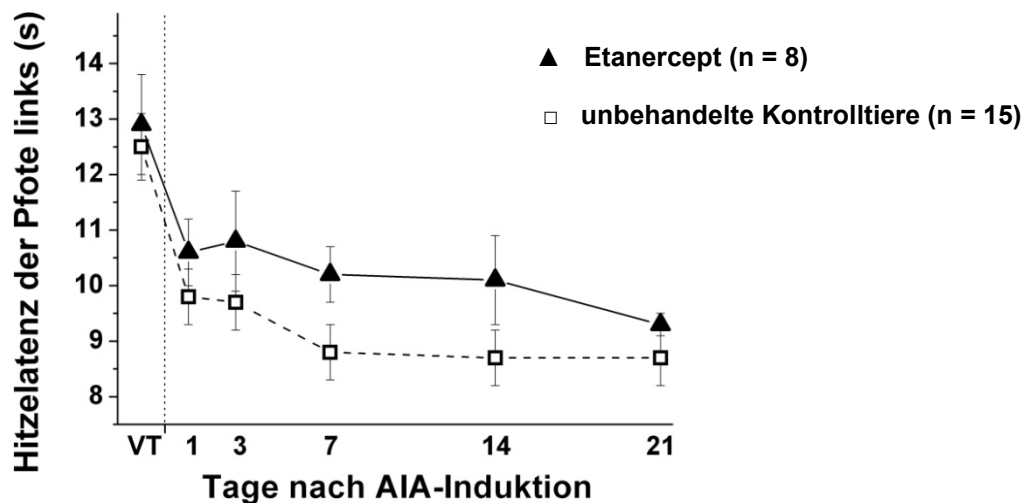


Abbildung 4.17: Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten der Etanercept-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.12.

4.3.2.4 Bestimmung der Etanercept-Konzentration im Serum

Die Etanercept-Konzentration im Serum wurde von vier Tieren bestimmt. Der Mittelwert lag diesbezüglich bei 14,95 ng/ml, bezogen auf eine Serummengende von 4 ml entspricht dies ca. 60 ng Etanercept im Serum.

4.3.3 Intrathekale Applikation von Morphin

Für die Versuche verwendeten wir acht Ratten. Die Tiere zeigten nach den zwei Operationen und an den ersten drei Untersuchungstagen keine

Verhaltensauffälligkeiten. Ab Tag 14 war jedoch eine deutliche motorische Unruhe zu erkennen.

4.3.3.1 Schwere der Entzündung

4.3.3.1.1 Schwellung

Die Schwellungen der linken Kniegelenke erreichten bei den Morphin-behandelten Ratten auch ihr Maximum an den Tagen 1 und 3. Dabei zeigten sich jedoch keinerlei Gruppenunterschiede (Abb 4.18).

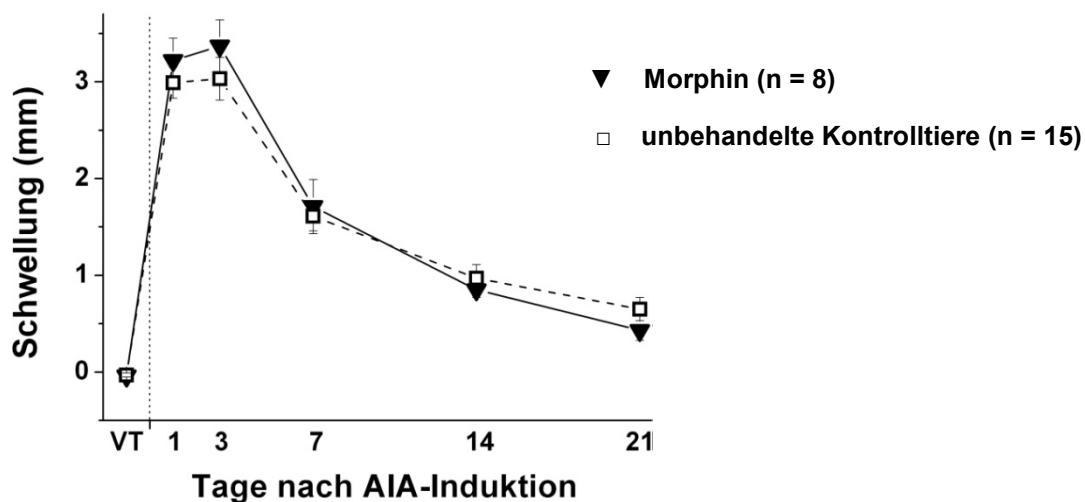


Abbildung 4.18: Differenz der Kniegelenksdurchmesser (links – rechts) der Morphin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: ▼ Morphin (n = 8), □ unbehandelte Kontrolltiere (n = 15). VT - Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). Mittelwerte \pm SEM.

4.3.3.1.2 Histologie der Kniegelenke

Zeichen der akuten Entzündung konnten im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollen am Tag 21 bei den Morphin-behandelten Ratten nicht erkannt werden (Abb. 4.19 A).

Chronische Entzündungszeichen waren in beiden Gruppen deutlich ausgeprägt (Abb. 4.19 B).

Histopathologische Zeichen der Destruktion waren bei den Tieren, die Morphin appliziert bekamen, zwar geringer ausgeprägt in Bezug auf die unbehandelten

Kontrollen, unterschieden sich jedoch nicht signifikant von diesen (Abbildung 4.19 C).

Die dazugehörige Histomorphologie ist in den Abbildungen 4.7 G und H dargestellt.

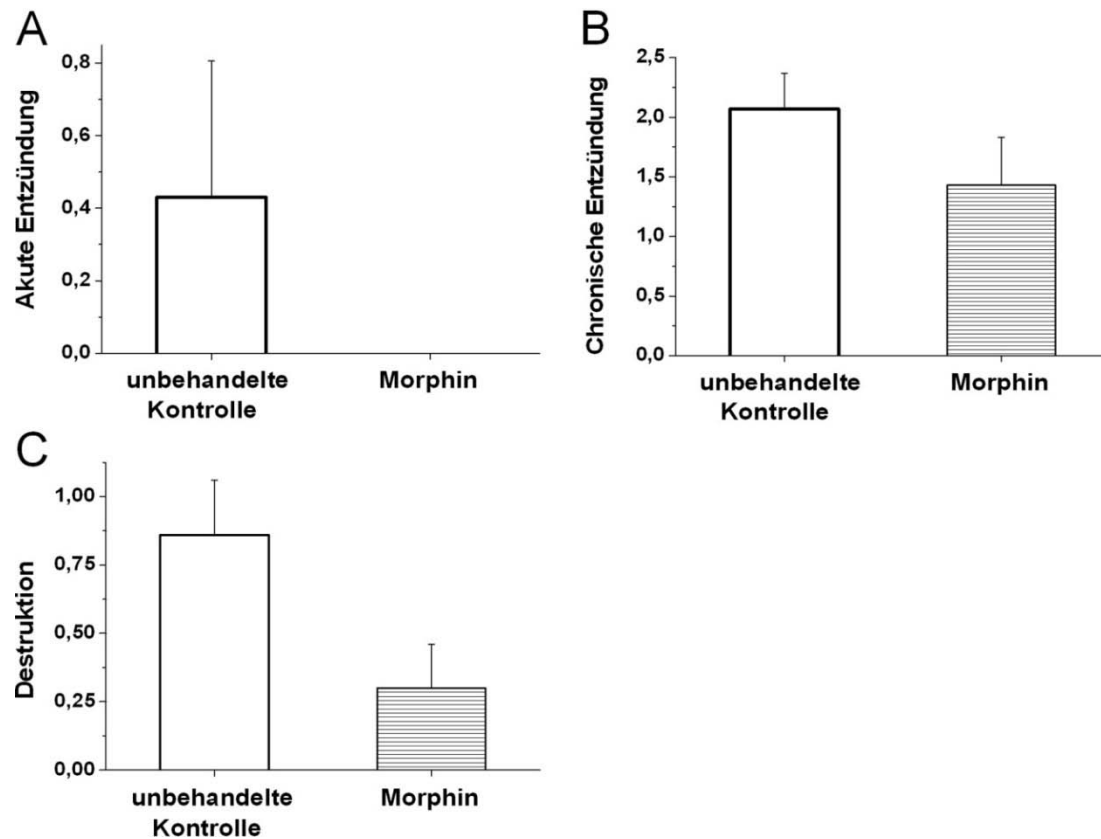


Abbildung 4.19: Ausprägung der akuten (A) und chronischen Entzündungszeichen (B) sowie der Knorpel- und Knochendestruktion (C) am Tag 21 nach Entzündungsinduktion bei den Morphin-behandelten Tieren (n = 8) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (n = 15). Mittelwerte \pm SEM.

4.3.3.2 Motorische Verhaltenstests

4.3.3.2.1 Dynamische Testung

Wie Abbildung 4.20A zeigt, konnte man bei den Morphin-behandelten Ratten eine geringere Verkürzung der links-rechts Abstände der Abdrücke der Hinterpfoten in der Akutphase, vor allem am Tag 1, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren beobachten. In der chronischen Phase der Arthritis (ab Tag 7) war eine Annäherung der Werte von beiden Gruppen zu erkennen.

Die Breiten zwischen den Pfotenabdrücken veränderten sich in der Akutphase unter Morphinbehandlung nicht im Vergleich zum Ausgangswert, der bei den Vortestungen erhoben wurde (von 2,6 cm bei der Vortestung auf 2,8 cm an Tag 3). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Kontrolltieren in der Akutphase eine deutliche Verbreiterung des Ganges von 2,6 auf 3,5 cm und damit ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Beim Übergang in die chronische Phase nahm die Breite bei den behandelten Tieren auf einen Wert von 3,1 cm an Tag 7 zu, während der der Kontrolltiere nur leicht auf 3,1 cm sank. An Tag 14 konnte wieder ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen registriert werden.

Bei der Außenrotation der Hinterpfoten (Winkel), die in Abbildung 4.20 B abgebildet ist, kann man ein ähnliches Muster beobachten. An den Tagen 1 und 3 konnte man nur geringe Zunahmen der Außenrotation bei den Morphin-behandelten Ratten erkennen, die dann beim Übergang in die chronische Phase etwas zugenommen haben und ab Tag 14 dann wieder gesunken sind. Die Außenrotation war während des kompletten Untersuchungszeitraumes signifikant von den Kontrolltieren verschieden [$F(1,6) = 79,273$; $p < 0,001$].

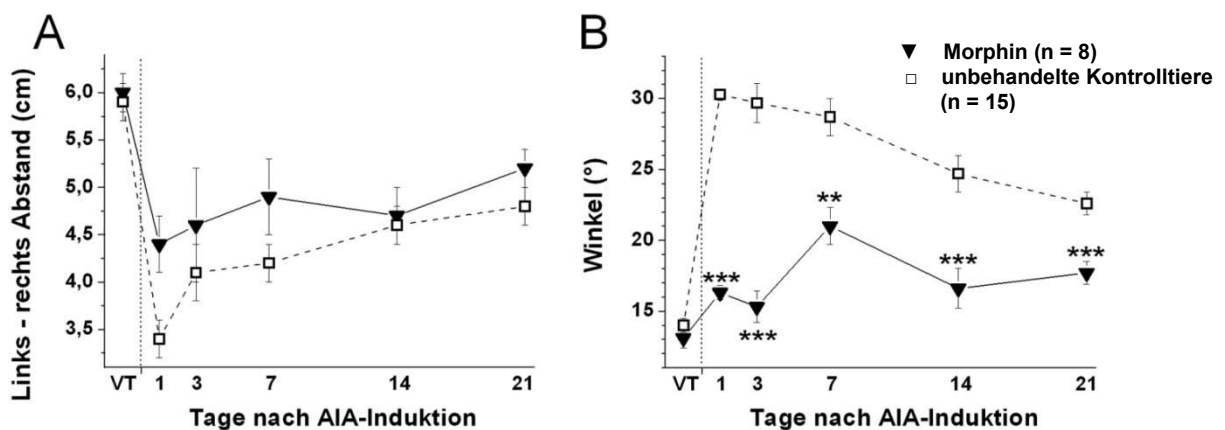


Abbildung 4.20: Links-rechts Abstände (A) und Rotationswinkel (B) zwischen den Pfotenabdrücken der Morphin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abb. 4.18. Die Sternchen stellen das Signifikanzniveau dar: ** = $< 0,01$; *** = $< 0,001$.

4.3.3.2 Statische Testung

Die Gewichtsverlagerungen auf die Hinterpfoten waren während der Akutphase bei den Morphin-behandelten Tieren nicht ganz so stark auf die gesunde rechte

Seite verschoben. Beim Übergang in die chronische Phase der Entzündung verschob sich die Verteilung des Körpergewichts der behandelten Ratten immer mehr auf die linke Seite. Wie man in Abbildung 4.21 erkennen kann, ist es weder bei den Morphin-behandelten Ratten noch bei den unbehandelten Tieren am Ende des Beobachtungszeitraums wieder zu einer Gleichverteilung des Gewichts auf beide Hinterpfoten gekommen, wie sie vor der Entzündung vorhanden war.

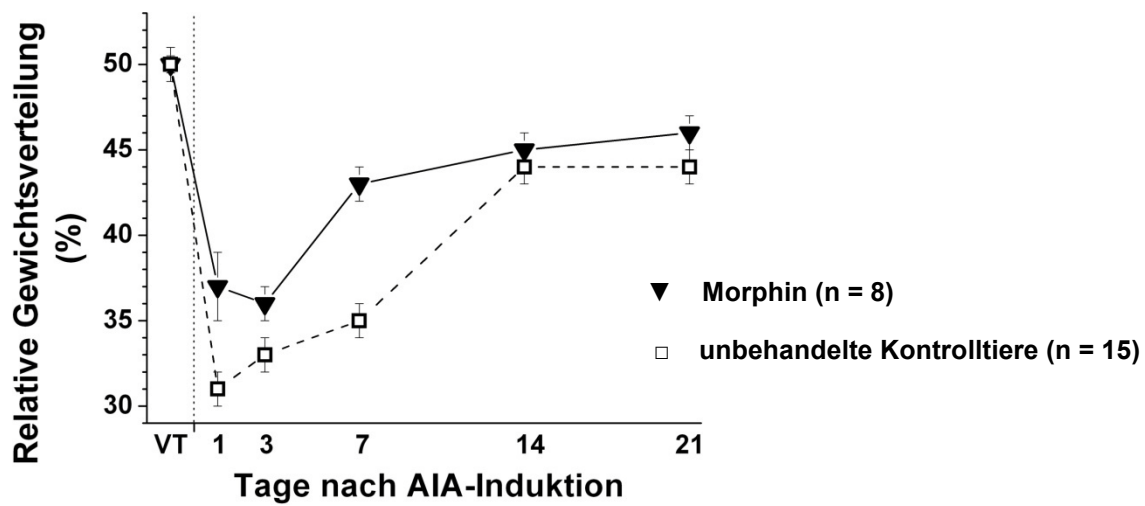


Abbildung 4.21: Relative Gewichtsverlagerung auf die linken hinteren Extremitäten der Morphin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abbildung 4.18.

4.3.3.3 Schmerzassoziierte Verhaltenstests

4.3.3.3.1 Messung der primären mechanischen Hyperalgesie

Wie in Abbildung 4.22 A gezeigt, war zwar an Tag 1 ein Unterschied der Wegzugsschwellen der linken Kniegelenke zwischen den Morphin-behandelten Ratten und den unbehandelten Kontrollen erkennbar, jedoch stellte sich ab Tag 3 bei den behandelten Ratten ein Gleichbleiben der Schwellen ein, die sich von den Kontrolltieren nicht unterschieden. Insgesamt war kein signifikanter Gruppenunterschied nachweisbar.

Auf der rechten Seite konnte während der Akutphase keine Veränderung der Schmerzschwellen des Knies bei den Ratten, die Morphin appliziert bekamen, festgestellt werden. Diese nahmen jedoch, wie in der Abbildung 4.22 B zu erkennen ist, beim Übergang in die chronische Phase langsam stetig ab.

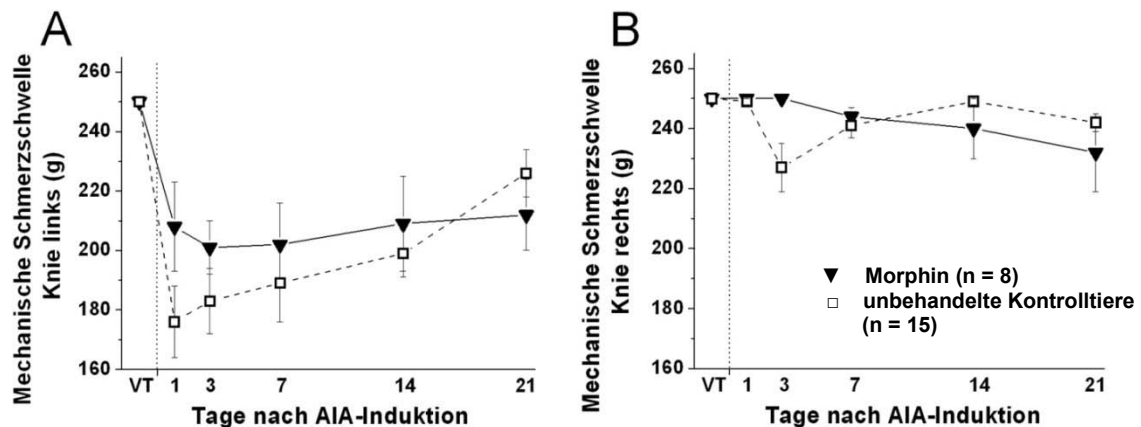


Abbildung 4.22: Mechanische Schmerzschwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Kniegelenke der Morphin-behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abbildung 4.18.

4.3.3.3.2 Messung der sekundären mechanischen Hyperalgesie

Die Zeit, nach der die Ratten ihre Hinterpfoten wegzogen, betrug vor der Entzündungsauslösung bei den Morphin-behandelten Tieren $9,1 \pm 2,2$ s sowie bei den unbehandelten Kontrollen $8,8 \pm 2,7$ s. In der Akutphase (Tage 1 bis 3) konnte bei den behandelten Tieren ein späteres Wegziehen der linken Hinterpfoten (nach $7,5 \pm 2,3$ s am Tag 3) als bei den Kontrollen, die ihre Pfoten schon nach $4,9 \pm 1,8$ s wegzogen, beobachtet werden. Beim Übergang in die chronische Phase der Entzündung wurde ein starkes Absinken der Wegzugs-Schwellen auf $4,5 \pm 1,6$ s bei den behandelten Tieren registriert, die sich dann ab dem Tag 14 komplett an die der unbehandelten Kontrollen annäherten.

4.3.3.3.3 Messung der sekundären thermischen Hyperalgesie

Wie in Abbildung 4.23 zu erkennen ist, konnte bei der Beobachtung der Hitzelatenzen der linken Hinterpfoten zwischen den Morphin-behandelten Ratten und den unbehandelten Kontrollen kein Unterschied während des gesamten Beobachtungszeitraums festgestellt werden.

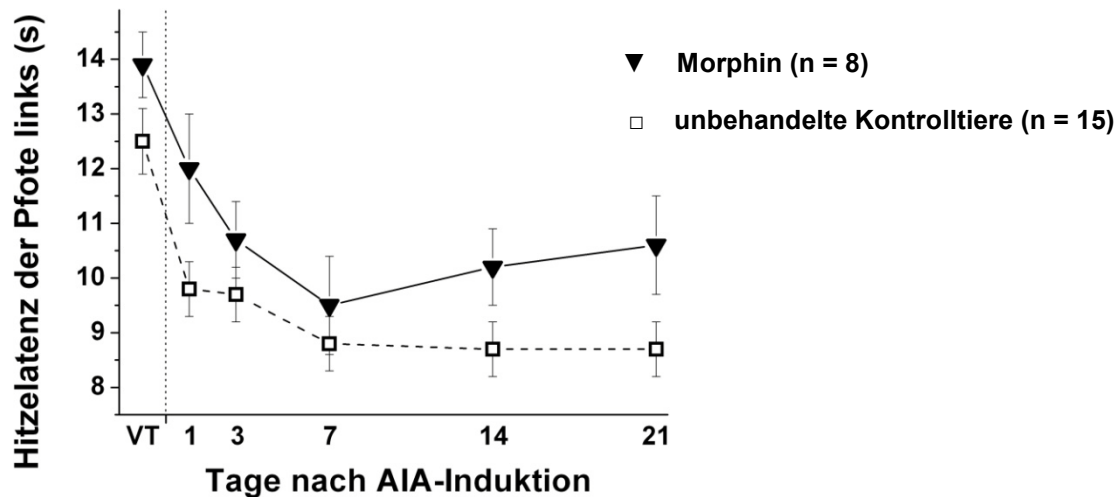


Abbildung 4.23: Hitzelelatenzen der linken Pfoten der Morphin-behandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen im Verlauf der Arthritis. Legende: siehe Abbildung 4.18.

4.4 Zusammenfassung

In Tabelle 4.1 sind die Wirkungen der drei getesteten Substanzen sowie die der Kontrolle auf den Schmerz, die Entzündung und die Motorik in einer Gegenüberstellung zusammengefasst. Dabei wurde zum einen der Effekt auf die akute Phase, zum anderen der auf die chronische Phase der Entzündung dargestellt.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Effekte der drei verwendeten Substanzen

	akut			chronisch		
	Ketamin	Etanercept	Morphin	Ketamin	Etanercept	Morphin
Schmerz	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓
Entzündung	↓↓	↓↓	↓	↓↓	↓↓↓	
Motorik	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑

↓ geringgradig vermindert
 ↓↓ mäßiggradig vermindert
 ↓↓↓ stark vermindert

↑ geringgradig verbessert
 ↑↑ mäßiggradig verbessert
 ↑↑↑ stark verbessert

4.5 Histologie des Rückenmarks

Zur Beurteilung der Histologie des Rückenmarks wurde die spinale Leukozyteninfiltration bei 39 Ratten mittels Histochemie bewertet. Dabei wiesen 30 Ratten keinen Befall auf (Abbildungen 4.24 A, B). Bei neun Tieren war eine randständige meningeale Infiltration zu beobachten (Abbildungen 4.24 C, D). Keine Ratte wies einen Einbruch der Entzündungszellen in das Mark auf. Damit konnte bei allen Ratten eine Myelitis ausgeschlossen werden. Die schmerzassoziierten und motorischen Parameter waren zwischen den Tieren mit randständig infiltrierten Meningen und denen ohne Infiltration nicht unterschiedlich.

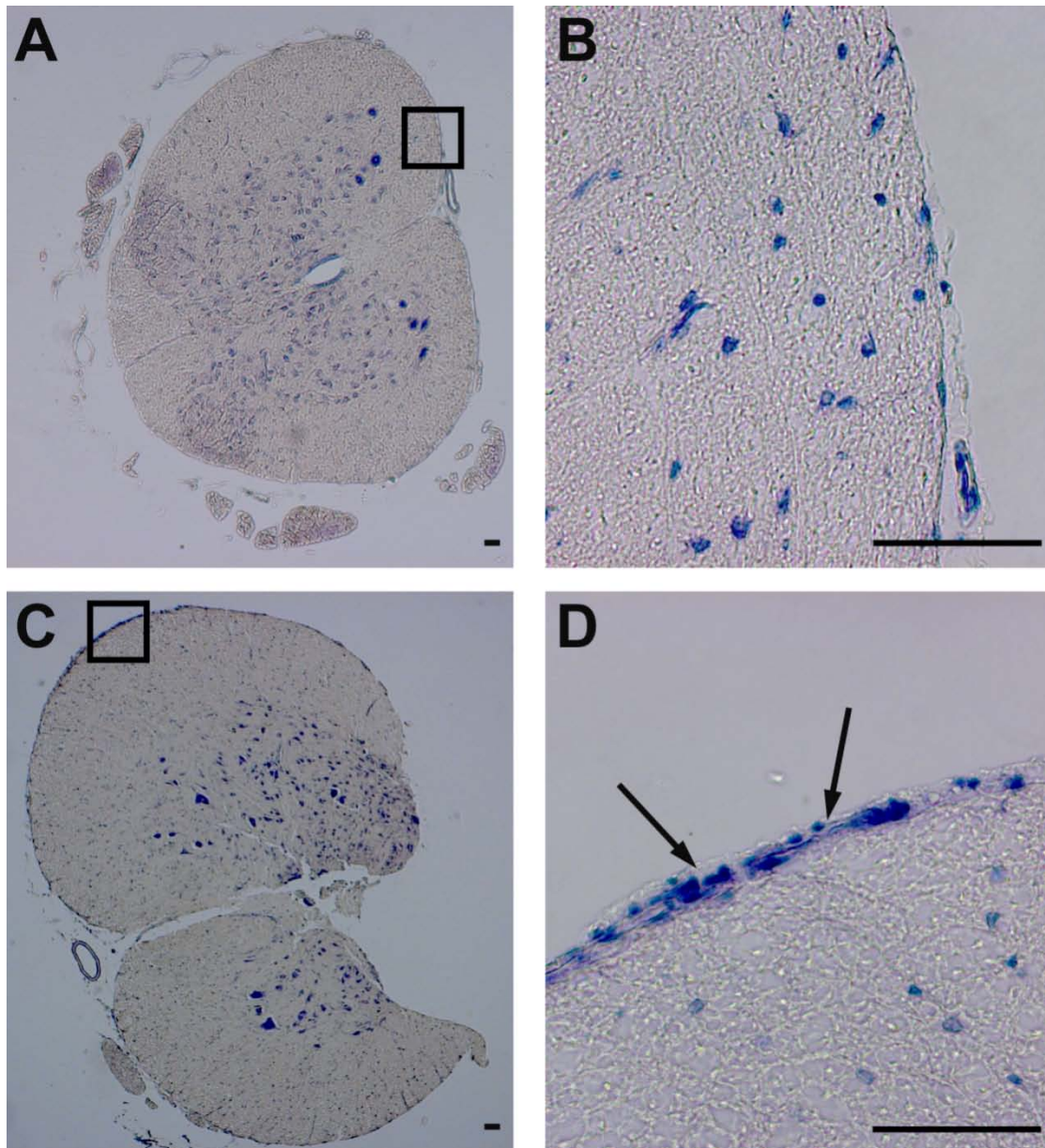


Abbildung 4.24: Repräsentative Ausschnitte von nach Pappenheim-gefärbten Rückenmarksschnitten ohne (A, B) mit randständiger meningealer Infiltration durch Leukozyten (C, D). Die in A und C markierten Ausschnitte sind in höherer Vergrößerung in B und D dargestellt. Pfeile in D: Randbefall von Entzündungszellen. Die Balken entsprechen 50 μm .

5 Diskussion

In dieser Arbeit zeigen wir, dass die intrathekale Gabe von Ketamin, Etanercept oder Morphin in unterschiedlichem Ausmaß die periphere Entzündung sowie die damit verbundenen Verhaltensauffälligkeiten wie schmerzassoziertes und motorisches Verhalten beeinflusst (siehe auch Tabelle 4.1).

5.1 Intrathekale Ketamingabe

Eine der grundlegenden Hypothesen für diese Arbeit war die Annahme, dass die intrathekale Applikation von Ketamin einen antinozizeptiven Effekt bei einer peripheren Entzündung aufweist. Demzufolge erwarteten wir, dass diese Therapie die sich stets nach Entzündungen entwickelnde primäre und sekundäre Hyperalgesie verringern würde.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich erkennen, dass intrathekal verabreichtes Ketamin in der verwendeten Dosierung eine antinozizeptive Wirkung auf die experimentell induzierte primäre und sekundäre Hyperalgesie zeigte. Demnach kann postuliert werden, dass die spinalen nozizeptiven Neurone von dem NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin in ihrer Aktivität beeinflusst wurden. Es ist bekannt, dass Ketamin die C-Faser-vermittelte nozizeptive Verarbeitung des Rückenmarks bei monoarthritischen Ratten stärker beeinflusst als bei gesunden Ratten (Laurido et al., 2001). NMDA-Rezeptor-Antagonisten sind als effektive antinozizeptive Medikamente in monoarthritischen Ratten beschrieben (Hama et al., 2003; Neugebauer et al., 1994; Ren und Dubner, 1993; Wang et al., 2000). Die intrathekale oder epidurale Applikation von Ketamin wurde bislang in mehreren tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen zur Schmerzreduktion eingesetzt (Chia et al., 1998; Gebhardt, 1994; Kawamata et al., 2000; Klimscha et al., 1998; Reich und Silvay, 1989). Dabei konnten Klimscha et al. (Klimscha et al., 1998) in einer tierexperimentellen Untersuchung einen antinozizeptiven Effekt für intrathekales Ketamin auf die thermische Hyperalgesie aufzeigen, was unsere Ergebnisse bestätigt.

Weiterhin konnte in einer Studie von Pelissier und Mitarbeitern (Pelissier et al., 2003) nachgewiesen werden, dass eine chronische Ketaminapplikation Antinozizeption bei monoarthritischen Ratten hervorruft und signifikant die

mechanische Hyperalgesie unterdrückt. Diese Resultate stehen ebenfalls im Einklang mit unseren Ergebnissen. Demnach wirkte eine anhaltende Ketamin-Gabe effektiv gegen chronische Schmerzen während der kontinuierlichen Behandlung. Jedoch konnte diese Arbeitsgruppe auch zeigen, dass nach Beenden der Therapie die NMDA-rezeptorabhängigen Verarbeitungswege hochreguliert bleiben und sich aus diesem Grund sowohl Hyperalgesie als auch Allodynie in anderen Gegenden des Körpers entwickeln und fortbestehen können. Auch Kawamata et al. (Kawamata et al., 2000) fanden einen antihyperalgetischen Effekt von intrathekal verabreichtem Ketamin bei der Carrageenan-induzierten Pfotenentzündung an der Ratte. Die Wirksamkeit stieg dabei dosisabhängig zwischen 10 mg und 50 mg/ml.

Die von uns verwendete Konzentration war 20 mg/ml. Diese Konzentration erwies sich in der Dosisfindung, die wir zu Beginn der Versuchsreihe durchführten, als wirksame antinozizeptive Dosis ohne entsprechende motorische Nebenwirkungen. Da aus der Literatur (Ahuja, 1983; Burton et al., 1999; Ghorpade und Advokat, 1994; Laurido et al., 2001; Ren et al., 1992b; Schnoebel et al., 2005) verschiedene Konzentrationen in verschiedenen Tiermodellen bekannt waren und diese dort auch als Bolus verabreicht wurden und wir eine chronische Applikation für unser Studiendesign gewählt hatten, war eine Dosisfindung erforderlich. Dabei erwiesen sich 20 und 50 mg/ml als antinozizeptiv. Allerdings kam es bei der höheren von beiden Dosen direkt nach Applikation zu einer beidseitigen Hinterpfotenlähmung, die sich erst nach 25 Minuten zurückgebildet hatte. Aus diesem Grund entschieden wir uns für 20 mg/ml. Andere Verhaltensauffälligkeiten wie Agitation und motorische Unruhe (White et al., 1982) konnten in der von uns verwendeten Dosierung nicht beobachtet werden. Mit dieser Konzentration liegen wir direkt in dem von Kawamata et al. bestätigten antinozizeptiven Bereich.

Nun stellt sich auf der einen Seite die Frage, ob die Verminderung der Hyperalgesie wirklich ein durch Bindung von Ketamin am spinalen NMDA-Rezeptor-vermittelter Effekt ist. Im Hinblick darauf kann man sagen, dass gezeigt wurde, dass die intrathekale Applikation von Glutamat, aber auch von NMDA, eine bilaterale Hinterpfoten-Hyperalgesie bei Ratten erzeugte (Ferreira und Lorenzetti, 1994). Des Weiteren sind präsynaptische NMDA-Rezeptoren (Herrero et al., 1992; Liu et al., 1994; Liu et al., 1997) beschrieben, und die mRNA von NMDA-Rezeptoren wurde im Rückenmark nach entzündlicher Stimulation vermehrt

exprimiert (Tanaka et al., 1998; Waxman et al., 1999). Somit liegt zumindest die Zielstruktur für Ketamin in dem von uns verwendeten Modell vor. Weiterhin ist bekannt, dass Ketamin die Aktivität von Hinterhornneuronen im Entzündungsmodell senken konnte (Schaible et al., 1991), obgleich wir dies in unserem Modell nicht spezifisch nachgewiesen haben.

Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass sich auch im peripheren Nervensystem NMDA-Rezeptoren sowohl auf Primärafferenzen als auch auf synaptischen Nervenendigungen der Hinterwurzeln befinden (Carlton, 2001; Neugebauer, 2002). Daher stellt sich die Frage, ob der Effekt, den Ketamin in diesem Versuch erzielt hat, spinal oder peripher bedingt war, da möglicherweise bei der spinalen Applikation von Ketamin ein gewisser Anteil in der Peripherie angekommen sein kann. Um dies zu überprüfen, wurde die Ketamin-Konzentration im Serum der rückenmarksnah-behandelten Tiere bestimmt. Der Mittelwert lag diesbezüglich bei 2,05 ng/ml. Bei der von uns spinal applizierten Konzentration von 20 mg/ml entspricht dies dem 10^{-6} -ten Anteil der ursprünglich applizierten Konzentration. Da eine periphere Wirkung von Ketamin erst bei einer Konzentration von 50 mg/ml (Shaked et al., 2004) beschrieben ist, kann man davon ausgehen, dass der antinozizeptive Effekt durch Ketamin spinal bedingt war.

Es wird weiter diskutiert, dass Ketamin teilweise Interaktionen mit Opiat-Rezeptoren eingeht (Fink und Ngai, 1982; Smith et al., 1980a; Smith et al., 1980b), es existieren aber auch Berichte, die dies nicht bestätigen konnten (Fratta et al., 1980). Da wir für Morphin aber eine deutlich geringere antinozizeptive Wirkung nachgewiesen haben als für Ketamin, kann man die Interaktion mit Opiat-Rezeptoren zumindest als Hauptmechanismus für die starke antinozizeptive Potenz ausschließen.

Eine weitere von uns zu überprüfende Hypothese war, dass intrathekal appliziertes Ketamin die periphere Entzündung beeinflussen kann. Insgesamt konnten wir einen leichten antiinflammatorischen Effekt für intrathekal verabreichtes Ketamin nachweisen, da sich der Kniegelenksumfang im Akutmodell signifikant (Protokoll I), jedoch nicht im chronischen Modell (Protokoll II) von dem der unbehandelten Kontrolltiere unterschied. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein additiver Effekt der Narkose, die die Ratten im Akutmodell erhielten, zum Ketamin sein, da der Einfluss des Narkotikums, das ebenfalls auf

Rückenmarksebene wirkt, nicht eindeutig von der Ketaminwirkung zu unterscheiden war. Die histopathologische Auswertung zeigte in beiden Versuchsansätzen ähnliche Befunde.

Zu diesem Thema gibt es in der Literatur nach unserem Wissensstand nur unzureichende Daten. Diskutiert wurden bisher nur ein peripherer (siehe unten) und ein *in vitro* (siehe unten) nachgewiesener antiinflammatorischer Effekt (Kawasaki et al., 1999; Shaked et al., 2004; Zahler et al., 1999).

Der Effekt von Ketamin auf den Sepsisverlauf wurde sowohl in isolierten Zellen als auch in Ratten untersucht. In mononukleären Zellen der Ratte reduzierte Ketamin die Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Aktivierung von NF κ B (ein Transkriptionsfaktor, der in post-transkriptionaler Regulation der mRNA von immuninflammatorischen Mediatoren einbezogen ist) und hemmte die TNF- α -Synthese (Yu et al., 2002). In menschlichem Vollblut unterdrückte Ketamin die LPS-induzierte TNF- α -, IL-6- und IL-8-Bildung (Kawasaki et al., 1999). Bei Ratten unterdrückte Ketamin die Escherichia coli-induzierte Erhöhung des TNF- α - und IL-6-Spiegels (Taniguchi et al., 2001).

Eine weitere Studie zeigte einen weiteren Weg auf, über den Ketamin auf eine Entzündung wirken kann: es bewirkt *in vitro* einen antiadhäsiven Effekt auf die Leukozyten, die sich im Zuge einer Entzündung an die Endothelzellen binden (Zahler et al., 1999). Inwieweit einer dieser Mechanismen, die hier für die Peripherie aufgezeigt wurden, zur antientzündlichen Wirkung von intrathekal appliziertem Ketamin beiträgt, bleibt fraglich und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit kann man sagen, dass auch der antiinflammatorische Effekt, ebenso wie der antinozizeptive Effekt, spinal bedingt ist, da die peripher gemessene Konzentration sehr gering ist.

Weiterhin kann auch eine Interaktion mit spinalen Zytokinen diskutiert werden. So wurde gezeigt, dass die spinale Applikation von NMDA die Phosphorylierung der p38 MAPK im superfizialen Hinterhorn steigert, vor allem in Mikroglia, aber auch in einer signifikanten Anzahl an Lamina II-Neuronen (Svensson et al., 2003). Es ist bekannt, dass die spinale p38 MAPK die Produktion von TNF- α regulieren kann und so einen Einfluss auf die Ausbildung der Entzündung nimmt. Ob dieser Mechanismus zur antientzündlichen Wirkung von Ketamin beiträgt, ist unklar. Daher wäre es in zukünftigen Studien wichtig, bei intrathekalen Ketaminapplikation die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im Liquor oder im

Rückenmark zu bestimmen. Dies wäre auch im Hinblick auf die von uns gefundenen Effekte einer intrathekalen TNF-neutralisierenden Therapie von großem Interesse.

Des Weiteren zeigen unsere Ergebnisse Veränderungen in der Motorik, die eine Kniegelenksentzündung nach sich zieht, und die bei den nichtbehandelten Kontrolltieren deutlich ausgeprägt waren. Die besser ausgeprägte Motorik bei den Ketamin-behandelten Ratten könnte ein Zusatz-/Nebeneffekt der antinozizeptiven Wirkung des Ketamins sein, da die Ratten durch die geringere Schmerzempfindung besser auftreten konnten. Dafür sprechen würden die erhobenen Daten der Morphinversuche. Auch hier konnte in den ersten Tagen, bevor sich möglicherweise eine Toleranzentwicklung ausprägte (siehe unten), beobachtet werden, dass Morphin einen deutlichen Effekt auf die Motorik ausübt.

5.2 Intrathekale Etanerceptgabe

Die Hypothesen, die es zu untersuchen galt, waren, dass zentralnervöse Zytokine an der Entwicklung und Aufrechterhaltung einer peripheren Entzündung beteiligt sind und dass die intrathekale Applikation von TNF- α -neutralisierenden Substanzen (hier: Etanercept) eine periphere Entzündung und deren Auswirkungen auf das schmerzbezogene und motorische Verhalten beeinflussen kann.

In einem (früheren) Projekt an unserem Institut konnte gezeigt werden, dass systemisch appliziertes Etanercept das entzündungsbedingte motorische und schmerzbezogene Verhalten signifikant verbessert. Dahingegen waren die erhobenen Entzündungsparameter sowie die histopathologischen Veränderungen nur leicht abgeschwächt. Da die intraartikuläre Injektion von Etanercept die Antworten von Gelenkafferenzen auf mechanische Reizung des entzündeten Gelenks reduzierte (Boettger et al., 2008), wurde eine direkte Wirkungsweise am PNS postuliert. Aufbauend darauf sollte hier der Effekt von Zytokinen bzw. deren Neutralisation auf spinale Zellen untersucht werden.

Unsere Ergebnisse deuten auf einen antientzündlichen Effekt von intrathekal appliziertem Etanercept hin, da es als einzige der getesteten Substanzen schon in der Akutphase die Knieschwellung verringerte. Des Weiteren wiesen die Etanercept-behandelten Ratten die geringsten histopathologischen Merkmale für

chronische Entzündung und Destruktion auf. Wenn man diese Ergebnisse mit denen aus der oben genannten Studie vergleicht, scheint der Applikationsort einen bedeutenden Einfluss auf die antientzündliche Wirkung von Etanercept zu haben. Die Arbeitsgruppe um Boyle (Boyle et al., 2006) wies ebenfalls einen antiinflammatorischen Effekt von intrathekal appliziertem Etanercept nach. Jedoch unterschieden sich unsere Arbeiten in mehreren Ansätzen: 1. Wir nutzten als Entzündungsmodell die AIA, Boyle und Mitarbeiter hingegen die Adjuvans Arthritis. 2. untersuchten wir den Einfluss auf die akute und chronische Phase der Entzündung, die Arbeitsgruppe um Boyle dagegen nur auf die akute Phase. 3. Wir applizierten kontinuierlich intrathekal, Boyle und Mitarbeiter im Gegensatz nur einmalig. 4. Wir applizierten schon vor der Entzündungsauslösung, Boyle und seine Arbeitsgruppe erst nach der Arthritisauslösung und 5. Wir untersuchten die Auswirkung auf Entzündung, Schmerz und Motorik, die Arbeitsgruppe um Boyle hingegen nur auf die Entzündung.

Für die periphere Wirkung von Etanercept ist bekannt, dass es wie auch andere TNF- α -Inhibitoren für die Behandlung von rheumatoider Arthritis und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen wie juvenile idiopathische Arthritis, Morbus Crohn und psoriatische Arthritis eingesetzt wird (Chang und Girgis, 2007). Moreland et al. (Moreland et al., 1997) konnten zeigen, dass Etanercept in der Behandlung von schwerer rheumatoider Arthritis die Schmerzen und Entzündung reduzierte. Weiterhin zeigten Ergebnisse von Studien an Tieren die Wichtigkeit von TNF- α als entzündungsinduzierendes Molekül. In transgenen Mäusen, die deregulierte humane TNF- α -Gene exprimierten, entstanden spontan Entzündungen sowie destruktive Polyarthritiden (Keffer et al., 1991). Wenn diese Tiere mit monoklonalen Antikörpern (AK) gegen TNF- α vorbehandelt wurden, konnte die Entwicklung von Arthritis verhindert werden. Es konnte eine Verbesserung der Krankheitsaktivität in Mäusen mit Typ II-Kollagen-induzierte Arthritis gezeigt werden, wenn TNF- α möglichen TNF- α -Rezeptor Fusionsproteinen oder monoklonalen AK blockiert wurde. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass TNF- α in der Entzündung eine entscheidende Rolle einnimmt und zum anderen, dass die antientzündliche Wirkung von Etanercept in der Peripherie insbesondere über die Blockade bzw. die Nicht-Aktivierung von TNF- α -Rezeptoren abläuft.

Hinsichtlich spinaler Mechanismen weiß man lediglich, dass durch die intrathekale Applikation von Etanercept die Phosphorylierung der spinalen p38 MAPK blockiert wird (Boyle et al., 2006). So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der spinalen p38 MAPK die Entzündung und Gelenkdestruktion bei der Adjuvans Arthritis der Ratte reduziert. Somit stellt die spinale MAPK p38 eine Verbindung zwischen Peripherie und ZNS dar (Boyle et al., 2006). Ein möglicher Mechanismus wurde in einer Studie von Waldburger und Mitarbeitern (Waldburger et al., 2008a) postuliert. Sie konnten zeigen, dass eine kleine Dosis eines p38 MAPK-Inhibitors, der in den intrathekalen Raum appliziert wurde, die Herzratenvariabilität steigert. Diese Beobachtung weist auf eine mögliche Aktivierung des parasympathischen Nervensystems und somit des cholinergen antiinflammatorischen Pfades über die MAPK-Signalkaskade innerhalb des ZNS hin. Dabei könnte der alpha-7-Rezeptor eine wichtige Rolle spielen. So wurde beobachtet, dass Acetylcholin über die Stimulation von alpha-7-Rezeptoren auf Makrophagen die Entzündung reduzieren konnte (Wang et al., 2003). Außerdem konnte in einem *in vitro*-Experiment gezeigt werden, dass Acetylcholin über die Aktivierung von alpha-7-Rezeptoren die Bildung von Zytokinen und Chemokinen durch Synoviozyten senken konnte (Waldburger et al., 2008b). Wenn dieser Rezeptor in weiteren Studien als Schlüsselverbindung zwischen ZNS und peripherer Entzündung bestätigt wird, könnten selektive Agonisten von therapeutischem Nutzen sein und auch in nächsten Studien unserer Arbeitsgruppe eingesetzt werden. Diese Resultate bestätigen unsere Ergebnisse und deuten einen möglichen Wirkmechanismus von intrathekal appliziertem Etanercept an.

Des Weiteren ist bekannt, dass viele Zellstrukturen im ZNS sowohl TNFR1 als auch TNFR2 exprimieren (Kinouchi et al., 1991). Demzufolge befindet sich auch in diesem Fall die Zielstruktur in dem von uns eingesetzten Modell.

Der antiinflammatorische Effekt von Etanercept könnte auf der Neutralisierung von TNF- α beruhen, denn Etanercept bindet an die Zelloberfläche von TNF- α -Rezeptoren und agiert auf diese Weise als TNF- α -Antagonist (Mohler et al., 1993). TNF- α wird als proinflammatorisches Schlüsselmolekül angesehen und ist fähig die Entzündung voranzutreiben. Es induziert die Bildung anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 (Nawroth et al., 1986) oder stimuliert Fibroblasten Adhäsionsmoleküle zu exprimieren (Chin et al., 1990). Diese Mechanismen sind für die Peripherie beschrieben, daher nehmen wir an,

dass TNF- α auf ähnliche Weise auch spinale Neurone sensibilisieren könnte. Zumal zumindest in Neuropathiemodellen gezeigt werden konnte, dass TNFR im Rückenmark vermehrt exprimiert werden (Schäfers et al., 2003c).

Da Etanercept noch eine relativ neue Substanz ist, sind die pharmakologischen Interaktionen, die dieses Molekül eingehen kann, noch nicht 100 %-ig aufgeklärt. So ist es denkbar, dass dieses Molekül mit anderen Rezeptoren oder Molekülen eine Verbindung eingeht und auf diese Weise der antiinflammatorische Effekt hervorgerufen wird. Andererseits kann diese Vermutung durch die Ergebnisse einer Studie abgeschwächt werden (Boettger et al., 2008). In dieser zeigten sowohl Etanercept als auch Infliximab eine antientzündliche Wirkung durch Interaktionen mit TNF- α . Beide Substanzen haben den TNF-Rezeptor-bindenden Anteil gemeinsam, unterscheiden sich aber in ihrer Reststruktur, was mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen lässt, dass beide über denselben Mechanismus den antientzündlichen Effekt hervorrufen. Allerdings wurden diese Ergebnisse mit systemisch verabreichten Substanzen erzielt. Ob Etanercept spinal über denselben Mechanismus wirkt, bleibt zu klären.

Um ausschließen zu können, dass der Effekt, den spinal appliziertes Etanercept hervorgebracht hat, nicht peripher bedingt war, wurde die Etanercept-Konzentration im Serum bestimmt. Der Mittelwert lag diesbezüglich bei 14,95 ng/ml. Da die osmotische Minipumpe pro Stunde 2,5 μ l in den Intrathekalraum pumpt, ergibt sich für einen Tag eine Menge von 60. Bei einer Konzentration von 2,63 mg/ml resultiert daraus eine Gesamttagesdosis von ungefähr 158 μ g. Demnach entspricht die im Serum ermittelte Konzentration etwa dem 10^{-5} -ten Teil der Gesamtdosis. Dieser minimale Anteil an Etanercept wäre mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in der Lage, das gesamte TNF, das in der Peripherie bei einer Entzündung gebildet wird, abzufangen und zu neutralisieren. Aus diesem Grund gehen wir auch hier von einer primär spinalen Wirkungsweise aus.

Der antinozizeptive Effekt war insgesamt weniger stark ausgeprägt als der antiinflammatorische Effekt. Eine andere Studie am Institut hat gezeigt, dass systemisch appliziertes Etanercept selbst einen starken Einfluss auf den entzündungsbedingten Schmerz hat, da die Ratten keinerlei zusätzliche Analgetika bekamen (Boettger et al., 2008). Auch wurde in der genannten Studie beobachtet, dass Etanercept Antworten von C-Fasern auf mechanische Reizung des entzündeten Knies reduzierte. Weiterhin reduzierte Etanercept die thermische

und mechanische Hyperalgesie bei lokaler und systemischer Applikation in Mäusen mit experimenteller Neuropathie (Sommer et al., 2001). Eine Ursache für den in unserer Studie schwächeren antinozizeptiven Effekt von Etanercept könnte der Applikationsort sein, da die Studien, die einen starken antinozizeptiven Effekt aufwiesen, alle eine periphere Verabreichung der Substanz gemeinsam hatten. Die Therapie mit Etanercept wirkte sich auch positiv auf das motorische Verhalten aus. Wie auch für Ketamin diskutiert, bleibt der zu Grunde liegende Mechanismus jedoch spekulativ.

5.3 Intrathekale Morphingabe

Eine weitere Hypothese, die untersucht werden sollte, war, dass sich intrathekal appliziertes Morphin auf eine periphere Entzündung und die daraus resultierenden Schmerzen und Veränderungen in der Motorik auswirkt.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigten, dass intrathekal appliziertes Morphin, als dritte zu untersuchende Substanz, nur eine geringe antinozizeptive Potenz im Modell der AIA hat. Es ließ sich lediglich in der Akutphase ein leichter antinozizeptiver Effekt zeigen. Es wird außerdem ersichtlich, dass sich zwischen den Tagen 3 und 7 eine deutliche Abnahme der Wirksamkeit entwickelt, da entweder die Werte ab diesem Zeitpunkt stagnieren, wie bei der Bestimmung der primär mechanischen Hyperalgesie der linken Kniegelenke, oder ab Tag 3 stetig fallen wie bei der primären mechanischen Hyperalgesie des rechten Kniegelenke. Auf die Entzündung zeigte Morphin überhaupt keinen Effekt, da der Kniedurchmesser der Morphin-behandelten Ratten im Verlauf der Entzündung fast identisch zu denen der Kontrolltiere war. In der Histologie waren neben ausgeprägten chronischen Zeichen einer Entzündung auch deutlich Destruktionen in den Kniegelenken zu erkennen. Die Motorik der Tiere war in der Akutphase weniger stark eingeschränkt im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, jedoch glichen sich in der chronischen Phase die Werte wieder an.

Als Ursachen der relativ geringen antinozizeptiven Wirkung von Morphin kommen folgende Möglichkeiten in Betracht (siehe auch Ausführungen weiter unten): 1. die Dosierung von Morphin war zu niedrig, 2. die Dosierung von Morphin war zu hoch oder 3. es kam zu einer Toleranzentwicklung aufgrund der kontinuierlichen Applikation.

Wir haben uns bei der Wahl der Dosierung an der Arbeit von Stevens und Yaksh (Stevens und Yaksh, 1989) orientiert. Diese verwendeten in ihrer Studie aber kein Entzündungsmodell, sondern untersuchten lediglich, wann sich bei welcher Konzentration eine Toleranz entwickelt. Daher ist es vorstellbar, dass Morphin aufgrund dieser Dosierung einen schwachen antinozizeptiven Effekt aufwies.

Es ist aber bekannt, dass Opioide gegenüber noxischen Reizen eine größere antinozizeptive Wirksamkeit haben in Tieren mit peripherer Entzündung als in Kontrolltieren. Eine Begründung dafür könnte in Veränderungen in der Affinität oder Anzahl der μ -Opioid-Rezeptoren liegen. Allerdings zeigen die meisten Studien in Tieren mit Entzündung der Hinterpfote weder signifikante Veränderungen in der Opioid-Rezeptordichte noch in der Affinität innerhalb des Rückenmarks (Cesselin et al., 1980; Delay-Goyet et al., 1989; Stanfa und Dickenson, 1993), was darauf hinweisen könnte, dass die in der Peripherie beschriebenen Vorgänge auf Rückenmarksebene nicht stattfinden und Morphin aus diesem Grund in unserer Studie keinen so starken antinozizeptiven Effekt aufweist.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass intrathekal appliziertes Morphin die Pfortenschwellung im Rahmen einer Entzündungsreaktion signifikant vermindern kann (Brock und Tonussi, 2008). Dieses Ergebnis unterstützt die Idee, dass Morphin am Opioid-Rezeptor auf spinaler Ebene agiert, um einen antiödematösen Effekt auszuüben. Dabei scheint der NO/cGMP-Regelkreis eine wichtige Rolle zu spielen (Brock und Tonussi, 2008). Jedoch konnten wir diesen Effekt in unserer Arbeit nicht bestätigen, da sich bei uns die Kniegelenksschwellungen der Morphin-behandelten Ratten von denen, die keine Therapie bekamen, nicht unterschieden. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass Brock und Tonussi als Entzündungsmodell die Carrageenan-Entzündung der Pfote verwendeten, wohingegen wir die AIA des Knies einsetzten. Auch wurde bei ihnen eine einmalige intrathekale Morphinapplikation von 37, 75 und 150 nmol im Vergleich zu unserer kontinuierlichen Verabreichung verwendet. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien erklären.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine einmalige spinale hochdosierte Morphingabe zu Hyperalgesie, Allodynie, spontaner heftiger Ruhelosigkeit und Vokalisierung führen kann (Watanabe et al., 2003; Woolf, 1981; Yaksh und Harty, 1988). Außerdem wiesen Mäuse eine charakteristische

nozizeptive Reaktion nach intrathekalen Applikation von hochdosiertem Morphin auf (Sakurada et al., 1996). Es wurde diskutiert, ob hochdosiertes Morphin die präsynaptische Freisetzung von einem oder mehreren nozizeptiven Neurotransmittern/Neuromodulatoren wie SP, Glutamat oder CGRP im Hinterhorn des Rückenmarks fördert. Die Verhaltensveränderungen, die durch intrathekales hochdosiertes Morphin hervorgerufen werden, sind durch die Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon oder Naltrexon nicht umkehrbar, was auf einen Mechanismus hinweist, der nicht durch Opioid-Rezeptoren vermittelt wird (Watanabe et al., 2003; Woolf, 1981; Yaksh et al., 1986; Yaksh und Harty, 1988). Allerdings wurden diese Beobachtungen bei einer einmaligen Gabe von 60 - 90 nMol gemacht. In unserer Untersuchung erhielten die Ratten eine kontinuierliche Morphinapplikation von 6,7 nmol/h. Da die Halbwertszeit (HWZ) von Morphin 2-3 Stunden beträgt, und sich nach ca. fünf HWZ ein Steady State einstellt, würden dann theoretisch maximal 61 nmol Morphin im Spinalkanal vorhanden sein. Damit würde die dann vorhandene Morphin-Konzentration im Spinalkanal in dem o.g. Intervall liegen, bei dem durch die Morphingabe Hyperalgesie und Allodynie ausgelöst wurde. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die schlechte antinozizeptive Wirkung von Morphin in unserer Studie sein.

Der Zeitverlauf mit guter Wirksamkeit zu Beginn der Therapie, aber ein rasches Nachlassen nach ca. 7 Tagen (analog zu ca. 5 Tagen nach AIA) könnte daher Ausdruck der bekannten Toleranzentwicklung von intrathekal appliziertem Morphin sein. Es ist bekannt, dass ein anhaltender Gebrauch von Opiaten in einer antinozizeptiven Toleranz resultiert, bei der höhere Dosen des Opiats benötigt werden, um den gleichen analgetischen (Foley, 1995) oder antinozizeptiven (Ossipov et al., 2004) Effekt hervorzurufen.

Es gibt weiterhin Hinweise, dass spinale proinflammatorische Zytokine und Chemokine die Toleranzentwicklung von intrathekalem Morphin modulieren. Die spinalen IL-1-Proteinkonzentrationen sowie die spinale IL-6- und TNF-mRNA sind nach chronischer, jedoch nicht nach akuter, intrathekalen Morphinapplikation erhöht und konnten durch IL-1ra oder mittels Gentherapie, die das antiinflammatorische Zytokin IL-10 kodiert, vermindert werden. Zusätzlich konnte die Entwicklung von Toleranz, Hyperalgesie und Allodynie und die akute Morphinanalgesie potenziert werden (Johnston et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass die zusätzliche Verabreichung von intrathekalen NMDA-Rezeptor-

Antagonisten zu Morphin die Entwicklung und Ausprägung der analgetischen Toleranz des Morphins verhindern kann (Dunbar und Yaksh, 1996; Elliott et al., 1994; Marek et al., 1991). Diese Daten deuten darauf hin, dass die von Morphin hervorgerufene analgetische Toleranz und Hyperalgesie über verschiedene Transmittersysteme abläuft. In weiteren Studien könnte daher versucht werden, entsprechende Co-Substanzen zu applizieren, um eine mögliche Toleranzentwicklung als Ursache zu untersuchen. Zur letztendlichen Beantwortung der Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus der nachlassenden Wirksamkeit kann weiterhin versucht werden, verschiedene Dosen von Morphin in der gleichen kontinuierlichen Applikationsart intrathekal zu verabreichen.

Obwohl es in der Literatur Hinweise auf einen antiinflammatorischen Effekt von peripher verabreichten Opioiden gibt, konnten wir diesen in unsere Studie mit spinaler Applikation nicht erkennen. So konnte eine starke antientzündliche Wirkung für peripher applizierte μ -Rezeptor-Agonisten beobachtet werden (Walker, 2003). Auch μ -Rezeptoren vermitteln eine Morphin-induzierte TNF- α und IL-6-Hemmung in toll-like Rezeptor 2-stimulierten Monozyten (Bonnet et al., 2008). Da diese beiden Studien zum einen mit peripher applizierten Morphin und zum anderen *in vitro* durchgeführt wurden, bleibt es offen, in wie weit diese Mechanismen auch auf Rückenmarksebene ablaufen.

5.4 Vergleich zwischen den Gruppen

Die drei getesteten Substanzen wirken über verschiedene Mechanismen. Wenn man sie im Abschluss auf ihre Wirkung miteinander vergleicht, lässt sich sagen, dass Ketamin den größten antinozizeptiven Effekt aufwies, da es sowohl die primäre als auch die sekundäre Hyperalgesie verminderte. Bei Etanercept war der antinozizeptive Effekt etwas geringer ausgeprägt, da diese Substanz vor allem auf die primäre Hyperalgesie wirkte und fast keinen Effekt auf die sekundäre erzielte. Morphin wies die geringste antinozizeptive Wirkung auf, da es lediglich einen mäßigen Effekt auf die primäre Hyperalgesie in der Akutphase der Entzündung zeigte und im restlichen Verlauf kein Unterschied zur unbehandelten Kontrollgruppe zu erkennen war. Auf die sekundäre Hyperalgesie scheint es gar keine Wirkung zu haben.

Den größten antiinflammatorischen Effekt bei kontinuierliche intrathekalen Gabe hatte Etanercept, da es als einzige der drei Substanzen schon in der Akutphase auf die Kniegelenksschwellung wirkte, sodass diese bei den Etanercept-behandelten Ratten nicht so stark ausgeprägt war wie bei den anderen drei Gruppen. Außerdem zeigten diese Tiere die geringsten histologischen Veränderungen im Kniegelenk. Die Ketamin-behandelten Tiere wiesen einen nicht ganz so starken antientzündlichen Effekt auf, da sowohl die Schwellung als auch die histopathologischen Entzündungszeichen zumindest im Rahmen der kontinuierlichen Behandlung etwas stärker als bei den Etanercept-behandelten Ratten ausgebildet waren. Dagegen scheint Ketamin eine deutliche Reduktion der akuten Entzündungsantwort zu bewirken. Morphin zeigte gar keinen antientzündlichen Effekt, da die Schwellung genauso stark wie bei den unbehandelten Kontrollen, über den gesamten Beobachtungszeitraum vorhanden war und die Entzündungszeichen in den Kniegelenken sehr stark ausgeprägt waren.

Auf das motorische Verhalten wirkte Ketamin am effektivsten, da das Gangbild der Ratten am geringsten beeinträchtigt war und sich sowohl in der Gewichtsverlagerung als auch im Gangbild ab Tag 7 eine komplette Normalisierung im Sinne eines Zustandes wie vor der Entzündungsauslösung einstellte. Etanercept zeigte nur einen geringen Effekt auf die Motorik, da das Gangbild viel stärker beeinträchtigt war als bei den Ketamin-behandelten Ratten. Morphin hatte auch nur eine geringe Wirkung auf das motorische Verhalten. Das Gangbild der Morphin-behandelten Ratten war zwar in der Akutphase fast überhaupt nicht verändert in Bezug auf die Vortestung, die vor der Entzündung stattfand, zeigte aber ab Tag 7 eine eindeutige Verschlechterung. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

5.5 Diskussion des Modells

Das in der Arbeit verwendete Tiermodell zur Untersuchung der Wirksamkeit von intrathekal applizierten Substanzen ist gut geeignet, die antinozizeptive und antientzündliche Potenz dieser Stoffe zu betrachten. Durch die konstanten Versuchsbedingungen werden Kontroll- und Verumgruppen in ihren Ergebnissen reproduzierbar und vergleichbar. Das Modell der AIA bietet eine 100 %ige

Inzidenz für die Entwicklung einer akuten Arthritis mit den dazugehörigen typischen Merkmalen (Bräuer et al., 1988). Daneben bietet die AIA für Experimente weitere Vorteile. Zum einen wird das verwendete Antigen nur in das Gelenk injiziert, welches sich später entzünden soll. Darüber hinaus entwickelt sich die akute Phase der Entzündung innerhalb der ersten Stunden nach Antigen-Injektion in das Gelenk. Der Übergang in den chronischen Abschnitt verläuft spontan und immer zum gleichen Zeitpunkt (Buchner et al., 1995; Griffiths, 1992; Roth et al., 2005; Segond von Banchet et al., 2000).

Um die spinale Wirkung eines Pharmakons zu ermitteln, ist die Implantation eines Intrathekalkatheters und Applikation der Substanz über diesen eine häufig verwendete Methode (Bennett et al., 2000; Boyle et al., 2006). Dieses Verfahren wurde von Yaksh (Yaksh und Rudy, 1976) in den 70er Jahren etabliert. Einen Vorteil bietet die Überwindung der Blut-Hirn- sowie der Blut-Liquor-Schranke, die eine Barriere für den Übergang bestimmter Stoffe aus dem Blut in das Gehirn bzw. in den Liquor darstellt. Jedoch besteht bei der Katheteranlage die Gefahr einer Neuropathie. Aus diesem Grund wurden die Ratten nach der Operation beobachtet. Die Tiere, die eine Parese aufwiesen, wurden aus dem Versuch genommen. Zusätzlich dazu wurde im Anschluss an die Versuchsreihe nach 21 Tagen das Rückenmark entnommen und histologisch auf Entzündung im Sinne einer Myelitis oder Meningitis untersucht, die durch die kontinuierliche Lage des Katheters hervorgerufen werden können. In unseren Versuchen wiesen lediglich 9 der 39 Ratten eine minimale randständige Infiltration der Meningen auf, wobei sich die Verhaltensdaten dieser Tiere nicht von denen ohne Infiltration unterschieden. Da in den verschiedenen Gruppen zudem nur eine kleine Zahl von Tieren betroffen war, gehen wir davon aus, dass dies unsere Ergebnisse nicht beeinflusst hat.

Durch die Verbindung mit Pumpensystemen ist eine kontinuierliche Applikation über einen längeren Zeitraum möglich. Es wäre auch denkbar, die Substanz täglich über einen nach außen endenden Katheter zu verabreichen. Auf diesem Weg besteht aber ein erheblich hohes Infektionsrisiko der Injektionsstelle und damit des Liquorraumes. Darüber hinaus bedeutet diese Art der Injektion für das Tier täglichen Stress, der die Ergebnisse bzw. das Verhalten der Tiere zusätzlich beeinflussen kann. Aus diesem Grund haben wir uns für das Pumpensystem entschieden. Ein Nachteil der kontinuierlichen Applikation ist, dass es kaum publizierte Vergleichsdaten gibt und somit Dosierungen empirisch berechnet

werden müssen. Dabei ist z.B. die Pharmakokinetik der applizierten Substanzen für den Liquor nicht bekannt, was gegebenenfalls zu Über- oder Unterdosierungen führen kann (siehe Diskussion für Morphin). Für Ketamin und Etanercept gehen wir wegen des beobachteten antinozizeptiven Effekts von einer richtig gewählten Dosierung aus.

Die Beurteilung des Kniegelenkschmerzes ist ein wichtiger Parameter für das Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen. Man unterscheidet dabei indirekte und direkte Messmethoden zur Erfassung des Kniegelenkschmerzes. Zu den indirekten Tests, die das Ausmaß der sekundären Hyperalgesie erfassen, gehören u.a. die statische Gewichtsverlagerung (Schott et al., 1994), die Ganganalyse (Kunkel-Bagden und Bregman, 1990), sowie die Messung der mechanischen (Anderson et al., 2005) und thermischen Sensibilität (Hargreaves et al., 1988) der Hinterpfote. Die direkte Messung wird zur Beurteilung der primären Hyperalgesie angewandt und kann mit Hilfe der Wegzugsschwelle auf einen Druckreiz auf das Knie bestimmt werden.

Bei den hier überwachten konstanten Versuchsbedingungen sowie einer ausreichenden Adaptationszeit der Tiere an die Testsysteme können zuverlässige Aussagen über die Interaktionen der zu testenden Substanzen im schmerzverarbeitenden System gemacht werden.

Rinderserumalbumin als entzündliches Antigen in den vorliegenden Untersuchungen verwendet, induzierte bei 71 von 72 Ratten das Vollbild einer Kniegelenkentzündung. Dies wurde neben der Schonhaltung der betroffenen Extremität ebenfalls durch die zu beobachtende Hyperämie sowie den Messungen der Zunahme des Kniegelenksumfangs bestätigt. Demnach hat mBSA wie beabsichtigt zu einer Entzündungsreaktion in dem betroffenen Gelenk geführt. Auch in der Literatur wird mBSA als Substanz beschrieben, die gut zur Entzündungsinduktion geeignet ist (Griffiths, 1992). Da bei der nichtbehandelten Kontrollgruppe eine ausgeprägte primäre und sekundäre Hyperalgesie bei mechanischer sowie thermischer Reizung zu sehen war und zusätzlich das Gangbild auch sehr stark beeinträchtigt war, lässt sich schließen, dass mBSA als Substanz gut für unsere Fragestellung geeignet ist.

5.6 Übertragbarkeit und Nutzen des Modells

In der Schmerz- und Entzündungsforschung stellt das Tiermodell ein vielfach verwendetes Untersuchungsobjekt dar. Es ist zur Aufklärung von Mechanismen und neuen Therapiestrategien unumgänglich. Die Ratte ist dabei ein häufig eingesetztes Versuchstier (Bachtler, 2004). Sie ist leicht unter Laborbedingungen zu halten und ihre genetischen Eigenschaften sind denen des Menschen sehr ähnlich (Consortium, 2004). Die häufige Einsetzbarkeit des Rattenmodells gewährleistet dabei eine gute Vergleichbarkeit verschiedener Studien. Somit stellt das Rattenmodell ein gutes Untersuchungsobjekt zur Erforschung der peripheren und spinalen Mechanismen der Schmerzverarbeitung dar. Des Weiteren bietet das Tiermodell die Möglichkeit, z.B. auch weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen, die beim Menschen nicht möglich wären.

Um die Pathogenese von Entzündungen zu untersuchen, muss ein intakter Organismus verwendet werden. *In vitro*-Versuche reichen dabei nicht aus, da einzelne Zellen nicht die Wirkmechanismen eines ganzen Organismus widerspiegeln können.

Die Beurteilung von Schmerz sowohl beim Menschen als auch beim Tier stellt ein generelles Problem dar. So muss sich beim Menschen aus ethischen Gründen auf einfache Mittel wie die Schmerzskala oder die benötigte Schmerzmittelmenge beschränkt werden (Chia et al., 1998; Huang et al., 2000). Auch bei der Ratte oder allgemein beim Tier stellen sich Probleme bei der Bewertung des Schmerzempfindens dar. So kann die Einschätzung, ob ein Tier Schmerzen hat oder nicht, nur durch das Erfassen von Surrogaten wie Wegziehen der Pfote, Vokalisieren oder der Gangbildanalyse abgeschätzt werden. Hierfür haben wir Verhaltenstests verwendet, die sowohl die primäre als auch die sekundäre Hyperalgesie erfassen (Neugebauer et al., 2007). Die Kombination aus verschiedenen Tests im Gegensatz zur Verwendung nur einer Methode erhöht dabei die Validität der getroffenen Aussagen.

Generell wird die Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen hinterfragt. Sie stellt jedoch im Rahmen der biomedizinischen Forschung eine anerkannte Methode zur Untersuchung von Mechanismus und Wirksamkeit von Medikamenten dar, auch wenn letzteres durch Unterschiede in der Pharmakokinetik bzw. -dynamik nicht immer übertragbar ist (Whiteside et al., 2008). Beides war Gegenstand unserer Studie.

Es wird deutlich, dass auch in Zukunft Schmerzforschung am Tiermodell nötig sein wird, um genaue Kenntnisse über die Physiologie und Pathologie des Schmerzes zu erlangen und objektive Aussagen über qualitative und quantitative Wirkungsweisen von Analgetika machen zu können.

5.7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von verschiedenen spinal applizierten Substanzen auf eine periphere Entzündung, das Schmerz- und motorische Verhalten untersucht werden. Aus unseren Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen treffen:

1. Das zentrale Nervensystem steuert zu einem signifikanten Anteil peripher ablaufende Entzündungsvorgänge mit.
2. Spinale Mechanismen scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation einer peripheren Entzündung zu spielen, insbesondere spinale Zytokine.

Über welchen efferenten Mechanismus dieser Einfluss vermittelt wird, ist aus den dargestellten Ergebnissen nicht abzuleiten und sollte daher Gegenstand weiterer Studien sein. In Frage kommen Sympathikus, Parasympathikus und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, da diese einen Einfluss auf Entzündungen nehmen können. Insgesamt könnte jedoch eine spinale Applikation in Zukunft bei schweren Fällen von Arthritis eine zusätzliche therapeutische Option darstellen.

Literaturverzeichnis

- Aanonsen, L.M., Lei, S., Wilcox, G.L., 1990. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*. 41, 309-21.
- Adcock, I.M., Ito, K., 2000. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Monaldi Arch Chest Dis*. 55, 256-66.
- Ahuja, B.R., 1983. Analgesic effect of intrathecal ketamine in rats. *Br J Anaesth*. 55, 991-5.
- Anderson, K.D., Gunawan, A., Steward, O., 2005. Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp Neurol*. 194, 161-74.
- Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R., Lodge, D., 1983. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*. 79, 565-75.
- Antoni, F.A., 1993. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol*. 14, 76-122.
- Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 81, 1269-304.
- Ascher, P., Nowak, L., 1988. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol*. 399, 247-66.
- Bachtler, B., 2004. Genom der Laborratte entziffert und analysiert - Neue Erkenntnisse über Krankheitsursachen erwartet - Ein Einblick in die Evolution der Säugetiere. Vol., ed. eds. www.mdc.helmholtz.de.
- Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 94, 557-72.
- Barton, N.J., Strickland, I.T., Bond, S.M., Brash, H.M., Bate, S.T., Wilson, A.W., Chessell, I.P., Reeve, A.J., McQueen, D.S., 2007. Pressure application measurement (PAM): a novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain. *J Neurosci Methods*. 163, 67-75.
- Basbaum, A.I., Wall, P.D., 1976. Chronic changes in the response of cells in adult cat dorsal horn following partial deafferentation: the appearance of responding cells in a previously non-responsive region. *Brain Res*. 116, 181-204.

- Bennett, G., Serafini, M., Burchiel, K., Buchser, E., Classen, A., Deer, T., Du Pen, S., Ferrante, F.M., Hassenbusch, S.J., Lou, L., Maeyaert, J., Penn, R., Portenoy, R.K., Rauck, R., Willis, K.D., Yaksh, T., 2000. Evidence-based review of the literature on intrathecal delivery of pain medication. *J Pain Symptom Manage.* 20, S12-36.
- Bennett, G.J., 2000. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage.* 19, S2-6.
- Besse, D., Lombard, M.C., Zajac, J.M., Roques, B.P., Besson, J.M., 1990. Pre- and postsynaptic location of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the dorsal horn of the rat spinal cord. *Prog Clin Biol Res.* 328, 183-6.
- Boettger, M.K., Hensellek, S., Richter, F., Gajda, M., Stöckigt, R., von Banchet, G.S., Brauer, R., Schaible, H.G., 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: Evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum.* 58, 2368-78.
- Bonnet, M.P., Beloeil, H., Benhamou, D., Mazoit, J.X., Asehnoune, K., 2008. The mu opioid receptor mediates morphine-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 inhibition in toll-like receptor 2-stimulated monocytes. *Anesth Analg.* 106, 1142-9, table of contents.
- Borovikova, L.V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G.I., Watkins, L.R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J.W., Tracey, K.J., 2000. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 405, 458-62.
- Boyle, D.L., Jones, T.L., Hammaker, D., Svensson, C.I., Rosengren, S., Albani, S., Sorkin, L., Firestein, G.S., 2006. Regulation of peripheral inflammation by spinal p38 MAP kinase in rats. *PLoS Med.* 3, e338.
- Brau, M.E., Sander, F., Vogel, W., Hempelmann, G., 1997. Blocking mechanisms of ketamine and its enantiomers in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. *Anesthesiology.* 86, 394-404.
- Bräuer, R., Thoss, K., Henzgen, S., Waldmann, G., 1988. Significance of cell-mediated and humoral immunity in the acute and chronic phase of antigen-induced arthritis in rabbits. *Exp Pathol.* 34, 197-208.
- Brock, S.C., Tonussi, C.R., 2008. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. *Anesth Analg.* 106, 965-71, table of contents.
- Buchner, E., Brauer, R., Schmidt, C., Emmrich, F., Kinne, R.W., 1995. Induction of flare-up reactions in rat antigen-induced arthritis. *J Autoimmun.* 8, 61-74.

- Burton, A.W., Lee, D.H., Saab, C., Chung, J.M., 1999. Preemptive intrathecal ketamine injection produces a long-lasting decrease in neuropathic pain behaviors in a rat model. *Reg Anesth Pain Med.* 24, 208-13.
- Cahusac, P.M., Evans, R.H., Hill, R.G., Rodriguez, R.E., Smith, D.A., 1984. The behavioural effects of an N-methylaspartate receptor antagonist following application to the lumbar spinal cord of conscious rats. *Neuropharmacology.* 23, 719-24.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., 1983. Sensitization of unmyelinated nociceptive afferents in monkey varies with skin type. *J Neurophysiol.* 49, 98-110.
- Carlton, S.M., 2001. Peripheral excitatory amino acids. *Curr Opin Pharmacol.* 1, 52-6.
- Cesselin, F., Montastruc, J.L., Gros, C., Bourgoin, S., Hamon, M., 1980. Met-enkephalin levels and opiate receptors in the spinal cord of chronic suffering rats. *Brain Res.* 191, 289-93.
- Chang, J., Girgis, L., 2007. Clinical use of anti-TNF-alpha biological agents--a guide for GPs. *Aust Fam Physician.* 36, 1035-8.
- Chia, Y.Y., Liu, K., Liu, Y.C., Chang, H.C., Wong, C.S., 1998. Adding ketamine in a multimodal patient-controlled epidural regimen reduces postoperative pain and analgesic consumption. *Anesth Analg.* 86, 1245-9.
- Chin, J.E., Winterrowd, G.E., Krzesicki, R.F., Sanders, M.E., 1990. Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 33, 1776-86.
- Coderre, T.J., Melzack, R., 1992. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci.* 12, 3665-70.
- Consortium, R.G.S.P., 2004. Genome sequence of the brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature.* 428, 493 - 521.
- Crisp, T., Perrotti, J.M., Smith, D.L., Stafinsky, J.L., Smith, D.J., 1991. The local monoaminergic dependency of spinal ketamine. *Eur J Pharmacol.* 194, 167-72.
- Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 107, 660-4.
- Davar, G., Hama, A., Deykin, A., Vos, B., Maciewicz, R., 1991. MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. *Brain Res.* 553, 327-30.

- Davies, S.N., Lodge, D., 1987. Evidence for involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.* 424, 402-6.
- Dayer, J.M., 2002. The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 69, 123-32.
- De Medinacelli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J., 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based measurements made from walking tracks. *Exp Neurol.* 77, 634 - 643.
- Delay-Goyet, P., Kayser, V., Zajac, J.M., Guilbaud, G., Besson, J.M., Roques, B.P., 1989. Lack of significant changes in mu, delta opioid binding sites and neutral endopeptidase EC 3.4.24.11 in the brain and spinal cord of arthritic rats. *Neuropharmacology.* 28, 1341-8.
- DeRijk, R., Michelson, D., Karp, B., Petrides, J., Galliven, E., Deuster, P., Paciotti, G., Gold, P.W., Sternberg, E.M., 1997. Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) production in humans: high sensitivity of TNF alpha and resistance of IL-6. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 2182-91.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 1059-64.
- Dickenson, A.H., 1990. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 307-9.
- Dickenson, A.H., Sullivan, A.F., 1990. Differential effects of excitatory amino acid antagonists on dorsal horn nociceptive neurones in the rat. *Brain Res.* 506, 31-9.
- Dickenson, A.H., 1991. Mechanisms of the analgesic actions of opiates and opioids. *Br Med Bull.* 47, 609 - 702.
- Dopp, J.M., Mackenzie-Graham, A., Otero, G.C., Merrill, J.E., 1997. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J Neuroimmunol.* 75, 104-12.
- Dougherty, P.M., Willis, W.D., 1991. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. *Pain.* 47, 85-93.
- Dougherty, P.M., Palecek, J., Paleckova, V., Sorkin, L.S., Willis, W.D., 1992. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli. *J Neurosci.* 12, 3025-41.

- Dougherty, P.M., Willis, W.D., 1992. Enhanced responses of spinothalamic tract neurons to excitatory amino acids accompany capsaicin-induced sensitization in the monkey. *J Neurosci.* 12, 883-94.
- Drummond, P.D., 1995. Noradrenaline increases hyperalgesia to heat in skin sensitized by capsaicin. *Pain.* 60, 311-5.
- Drummond, P.D., 1996. Independent effects of ischaemia and noradrenaline on thermal hyperalgesia in capsaicin-treated skin. *Pain.* 67, 129-33.
- Dunbar, S., Yaksh, T.L., 1996. Concurrent spinal infusion of MK801 blocks spinal tolerance and dependence induced by chronic intrathecal morphine in the rat. *Anesthesiology.* 84, 1177-88.
- Eide, P.K., Jorum, E., Stubhaug, A., Bremnes, J., Breivik, H., 1994. Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain.* 58, 347-54.
- Eide, P.K., Stubhaug, A., Oye, I., Breivik, H., 1995. Continuous subcutaneous administration of the N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonist ketamine in the treatment of post-herpetic neuralgia. *Pain.* 61, 221- 228.
- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 1999. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinol Metab.* 10, 359-368.
- Elliott, K., Minami, N., Kolesnikov, Y.A., Pasternak, G.W., Inturrisi, C.E., 1994. The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain.* 56, 69-75.
- Eskandari, F., Webster, J.I., Sternberg, E.M., 2003. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther.* 5, 251-65.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Bristow, A.F., Poole, S., 1988. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature.* 334, 698-700.
- Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., 1994. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 33, 1479-85.
- Fink, A.D., Ngai, S.H., 1982. Opiate receptor mediation of ketamine analgesia. *Anesthesiology.* 56.
- Foley, K.M., 1995. Misconceptions and controversies regarding the use of opioids in cancer pain. *Anticancer Drugs.* 6 Suppl 3, 4-13.

- Fratta, W., Casu, M., Balestrieri, A., Loviselli, A., Biggio, G., Gessa, G.L., 1980. Failure of ketamine to interact with opiate receptors. *Eur J Pharmacol.* 61, 389-91.
- Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs.* 15, 29-58.
- Gebhardt, B., 1994. [Pharmacology and clinical results with peridural and intrathecal administration of ketamine]. *Anaesthesist.* 43 Suppl 2, S34-40.
- Ghorpade, A., Advokat, C., 1994. Evidence of a role for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the facilitation of tail withdrawal after spinal transection. *Pharmacol Biochem Behav.* 48, 175-81.
- Go, V.L., Yaksh, T.L., 1987. Release of substance P from the cat spinal cord. *J Physiol.* 391, 141-67.
- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76, 6666-70.
- Griffiths, R.J., 1992. Characterisation and pharmacological sensitivity of antigen arthritis induced by methylated bovine serum albumin in the rat. *Agents Actions.* 35, 88-95.
- Grigg, P., Schaible, H.G., Schmidt, R.F., 1986. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol.* 55, 635-43.
- Haley, J.E., Sullivan, A.F., Dickenson, A.H., 1990. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat. *Brain Res.* 518, 218 - 226.
- Hama, A., Woon Lee, J., Sagen, J., 2003. Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 459, 49-58.
- Hamber, E.A., Viscomi, C.M., 1999. Intrathecal lipophilic opioids as adjuncts to surgical spinal anesthesia. *Reg Anesth Pain Med.* 24, 255-63.
- Hammer, M., 2004. Rheumatoide Arthritis. Vol., D.R.-L.B. e.V., ed. eds.
- Hao, J.X., Sjolund, B.H., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1998. Electrophysiological evidence for an antinociceptive effect of ketamine in the rat spinal cord. *Acta Anaesthesiol Scand.* 42, 435 - 441.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 32, 77-88.

- Harris, E.D., Jr., 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 322, 1277-89.
- Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H.G., Brauer, R., Segond von Banchet, G., 2007. The cytokine TNF α increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci.* 36, 381-91.
- Herrero, I., Miras-Portugal, M.T., Sanchez-Prieto, J., 1992. Positive feedback of glutamate exocytosis by metabotropic presynaptic receptor stimulation. *Nature.* 360, 163-6.
- Herrlich, P., 2001. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene.* 20, 2465-75.
- Hirota, K., Lambert, D.G., 1996. I.v. anaesthetic agents inhibit dihydropyridine binding to L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels in rat cerebrocortical membranes. *Br J Anaesth.* 77, 248-53.
- Huang, G.S., Yeh, C.C., Kong, S.S., Lin, T.C., Ho, S.T., Wong, C.S., 2000. Intra-articular ketamine for pain control following arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Sin.* 38, 131-6.
- Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R., 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 258, 577-80.
- Hylden, J.L., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L., Dubner, R., 1991. Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 194, 135-43.
- Iadarola, M.J., Brady, L.S., Draisci, G., Dubner, R., 1988. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain.* 35, 313-26.
- Inglis, J.J., Nissim, A., Lees, D.M., Hunt, S.P., Chernajovsky, Y., Kidd, B.L., 2005. The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 7, R807-16.
- Jänig, W., Levine, J.D., Michaelis, M., 1996. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res.* 113, 161-84.
- Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., Schmoll, R., Woolf, C.J., 2002. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron.* 36, 57-68.

- Johnston, I.N., Milligan, E.D., Wieseler-Frank, J., Frank, M.G., Zapata, V., Campisi, J., Langer, S., Martin, D., Green, P., Fleshner, M., Leinwand, L., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2004. A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. *J Neurosci.* 24, 7353-65.
- Karin, M., Chang, L., 2001. AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J Endocrinol.* 169, 447-51.
- Kawamata, T., Omote, K., Sonoda, H., Kawamata, M., Namiki, A., 2000. Analgesic mechanisms of ketamine in the presence and absence of peripheral inflammation. *Anesthesiology.* 93, 520-8.
- Kawasaki, T., Ogata, M., Kawasaki, C., Ogata, J., Inoue, Y., Shigematsu, A., 1999. Ketamine suppresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. *Anesth Analg.* 89, 665-9.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., Kollias, G., 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *Embo J.* 10, 4025-31.
- Kieffer, B.L., Gaveriaux-Ruff, C., 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol.* 66, 285-306.
- King, A.E., Thompson, S.W., Urban, L., Woolf, C.J., 1988. An intracellular analysis of amino acid induced excitations of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord slice. *Neurosci Lett.* 89, 286-92.
- Kinouchi, K., Brown, G., Pasternak, G., Donner, D.B., 1991. Identification and characterization of receptors for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 181, 1532-8.
- Klimscha, W., Horvath, G., Szikszay, M., Dobos, I., Benedek, G., 1998. Antinociceptive effect of the S(+)-enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats. *Anesth Analg.* 86, 561-5.
- Kobayashi, S., Kokubo, Y., Uchida, K., Yayama, T., Takeno, K., Negoro, K., Nakajima, H., Baba, H., Yoshizawa, H., 2005. Effect of lumbar nerve root compression on primary sensory neurons and their central branches: changes in the nociceptive neuropeptides substance P and somatostatin. *Spine.* 30, 276-82.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312-8.
- Kunkel-Bagden, E., Bregman, B.S., 1990. Spinal cord transplants enhance the recovery of locomotor function after spinal cord injury at birth. *Exp Brain Res.* 81, 25-34.

- Kurowska, M., Rudnicka, W., Kontny, E., Janicka, I., Chorazy, M., Kowalczewski, J., Ziolkowska, M., Ferrari-Lacraz, S., Strom, T.B., Maslinski, W., 2002. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J Immunol.* 169, 1760-7.
- Lamberts, S.W., Verleun, T., Oosterom, R., de Jong, F., Hackeng, W.H., 1984. Corticotropin-releasing factor (ovine) and vasopressin exert a synergistic effect on adrenocorticotropin release in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 58, 298-303.
- LaMotte, R.H., Lundberg, L.E., Torebjork, H.E., 1992. Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol.* 448, 749-64.
- Laurido, C., Pelissier, T., Perez, H., Flores, F., Hernandez, A., 2001. Effect of ketamine on spinal cord nociceptive transmission in normal and monoarthritic rats. *Neuroreport.* 12, 1551-4.
- Ledeboer, A., Sloane, E.M., Milligan, E.D., Frank, M.G., Mahony, J.H., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2005. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain.* 115, 71-83.
- Lee, H.L., Lee, K.M., Son, S.J., Hwang, S.H., Cho, H.J., 2004. Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model. *Neuroreport.* 15, 2807-11.
- Levine, J.D., Fye, K., Heller, P., Basbaum, A.I., Whiting-O'Keefe, Q., 1986. Clinical response to regional intravenous guanethidine in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 13, 1040-3.
- Li, Y., Ji, A., Weihe, E., Schafer, M.K., 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci.* 24, 9623-31.
- Liu, H., Wang, H., Sheng, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Basbaum, A.I., 1994. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 8383-7.
- Liu, H., Mantyh, P.W., Basbaum, A.I., 1997. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature.* 386, 721-4.
- Lodge, D., Johnson, K.M., 1990. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 81-6.
- Lorton, D., Bellinger, D., Duclos, M., Felten, S.Y., Felten, D.L., 1996. Application of 6-hydroxydopamine into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis. *J Neuroimmunol.* 64, 103-13.

- Lorton, D., Lubahn, C., Felten, S.Y., Bellinger, D., 1997. Norepinephrine content in primary and secondary lymphoid organs is altered in rats with adjuvant-induced arthritis. *Mech Ageing Dev.* 94, 145-63.
- MacDermott, A.B., Mayer, M.L., Westbrook, G.L., Smith, S.J., Barker, J.L., 1986. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature.* 321, 519-22.
- Mack, K.J., Killian, A., Weyhenmeyer, J.A., 1984. Comparison of mu, delta, and kappa opiate binding sites in rat brain and spinal cord. *Life Sci.* 34, 281-5.
- Madden, K.S., Sanders, V.M., Felten, D.L., 1995. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 35, 417-48.
- Mao, J., Price, D.D., Hayes, R.L., Lu, J., Mayer, D.J., 1992a. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 598, 271-8.
- Mao, J., Price, D.D., Mayer, D.J., Lu, J., Hayes, R.L., 1992b. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviors in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 576, 254-62.
- Mao, J., Price, D.D., Hayes, R.L., Lu, J., Mayer, D.J., Frenk, H., 1993. Intrathecal treatment with dextrophan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy. *Brain Res.* 605, 164-8.
- Marek, P., Ben-Eliyahu, S., Gold, M., Liebeskind, J.C., 1991. Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 547, 77-81.
- Mathisen, L.C., Skjelbred, P., Skoglund, L.A., Oye, I., 1995. Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain. *Pain.* 61, 215-20.
- Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P., Kieffer, B.L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature.* 383, 819-23.
- Maurset, A., Skoglund, L.A., Hustveit, O., Oye, I., 1989. Comparison of ketamine and pethidine in experimental and postoperative pain. *Pain.* 36, 37-41.
- McCleskey, E.W., Gold, M.S., 1999. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol.* 61, 835-56.
- McDougall, J.J., Watkons, L., Li, Z., 2006. Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a modulator of joint pain in a rat model of osteoarthritis. *Pain.* 123, 98 - 105.

- McKay, L.I., Cidlowski, J.A., 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev.* 20, 435-59.
- Messlinger, K., 1997. [What is nociceptor]. *Schmerz.* 11, 353-66.
- Miao, F.J., Green, P.G., Coderre, T.J., Janig, W., Levine, J.D., 1996. Sympathetic-dependence in bradykinin-induced synovial plasma extravasation is dose-related. *Neurosci Lett.* 205, 165-8.
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 66, 355-474.
- Miller, L.E., Justen, H.P., Scholmerich, J., Straub, R.H., 2000. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *Faseb J.* 14, 2097-107.
- Milligan, E.D., Mehmert, K.K., Hinde, J.L., Harvey, L.O., Martin, D., Tracey, K.J., Maier, S.F., Watkins, L.R., 2000. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res.* 861, 105-16.
- Mohler, K.M., Torrance, D.S., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Stremler, K.E., Fung, V.P., Madani, H., Widmer, M.B., 1993. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol.* 151, 1548-61.
- Morag, M., Yirmiya, R., Lerer, B., Morag, A., 1998. Influence of socioeconomic status on behavioral, emotional and cognitive effects of rubella vaccination: a prospective, double blind study. *Psychoneuroendocrinology.* 23, 337-51.
- Moreland, L.W., Baumgartner, S.W., Schiff, M.H., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., Weaver, A.L., Ettlinger, R.E., Cohen, S., Koopman, W.J., Mohler, K., Widmer, M.B., Bloch, C.M., 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med.* 337, 141-7.
- Murray, C.W., Cowan, A., Larson, A.A., 1991. Neurokinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. *Pain.* 44, 179-85.
- Nakamura-Craig, M., Gill, B.K., 1991. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. *Neurosci Lett.* 124, 49-51.
- Nawroth, P.P., Bank, I., Handley, D., Cassimeris, J., Chess, L., Stern, D., 1986. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med.* 163, 1363-75.

- Neugebauer, V., Lucke, T., Schaible, H.G., 1993. Differential effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists on the responses of rat spinal neurons with joint input. *Neurosci Lett.* 155, 29-32.
- Neugebauer, V., Lucke, T., Grubb, B., Schaible, H.G., 1994. The involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors in the responsiveness of rat spinal neurons with input from the chronically inflamed ankle. *Neurosci Lett.* 170, 237-40.
- Neugebauer, V., 2002. Metabotropic glutamate receptors--important modulators of nociception and pain behavior. *Pain.* 98, 1-8.
- Neugebauer, V., Han, J.S., Adwanikar, H., Fu, Y., Ji, G., 2007. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain.* 3, 8.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature.* 307, 462-5.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Ino, H., Chiba, T., Yamagata, M., Sameda, H., Moriya, H., 2002. Up-regulation of substance P and NMDA receptor mRNA in dorsal horn and preganglionic sympathetic neurons during adjuvant-induced noxious stimulation in rats. *Ann Anat.* 184, 71-6.
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H., Myers, R.R., 2004. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine.* 29, 1082-8.
- Oka, T., Hori, T., 1999. Brain cytokines and pain, Vol., Birkhäuser Verlag, Basel.
- Okuda, T., 1986. Comparison of direct and indirect depressant actions of ketamine on dorsal horn cells in rabbits. *Neuropharmacology.* 25, 433-40.
- Ossipov, M.H., Lai, J., King, T., Vanderah, T.W., Malan, T.P., Jr., Hruby, V.J., Porreca, F., 2004. Antinociceptive and nociceptive actions of opioids. *J Neurobiol.* 61, 126-48.
- Pavlov, V.A., Wang, H., Czura, C.J., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2003. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 9, 125-34.
- Pekoe, G.M., Smith, D.J., 1982. The involvement of opiate and monoaminergic neuronal systems in the analgesic effects of ketamine. *Pain.* 12, 57-73.
- Pelissier, T., Alvarez, P., Hernandez, A., 2003. Effect of long-term ketamine administration on vocalization to paw pressure and on spinal wind-up activity in monoarthritic rats. *Int J Neurosci.* 113, 1305-13.
- Pereira da Silva, J.A., Carmo-Fonseca, M., 1990. Peptide containing nerves in human synovium: immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 17, 1592-9.

- Perl, E.R., Kumazawa, T., Lynn, B., Kenins, P., 1976. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res.* 43, 263-77.
- Perry, V.H., Gordon, S., 1997. *Microglia and macrophages*, Vol., Oxford University Press, New York.
- Pert, P.C., Kenkar, M.J., Snyder, S.H., 1976. Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proceedings of the national academy of Sciences.* 73, 3729 - 3733.
- Pollock, J., McFarlane, S.M., Connell, M.C., Zehavi, U., Vandenabeele, P., MacEwan, D.J., Scott, R.H., 2002. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology.* 42, 93-106.
- Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1999. *Hyperalgesia from subcutaneous cytokines*, Vol., Birkenhäuser, Basel.
- Qian, J., Brown, S.D., Carlton, S.M., 1996. Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy. *Brain Res.* 715, 51-62.
- Rahman, W., Dashwood, M.R., Fitzgerald, M., Aynsley-Green, A., Dickenson, A.H., 1998. Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal morphine analgesia. *Brain Res Dev Brain Res.* 108, 239-54.
- Raigorodsky, G., Urca, G., 1987. Intrathecal N-methyl-D-aspartate (NMDA) activates both nociceptive and antinociceptive systems. *Brain Res.* 422, 158-62.
- Raja, S.N., 1995. Role of the sympathetic nervous system in acute pain and inflammation. *Ann Med.* 27, 241-6.
- Reich, D.L., Silvay, G., 1989. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth.* 36, 186-97.
- Reichenberg, A., Kraus, T., Haack, M., Schuld, A., Pollmacher, T., Yirmiya, R., 2002. Endotoxin-induced changes in food consumption in healthy volunteers are associated with TNF-alpha and IL-6 secretion. *Psychoneuroendocrinology.* 27, 945-56.
- Ren, K., Hylden, J.L., Williams, G.M., Ruda, M.A., Dubner, R., 1992a. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain.* 50, 331-44.

- Ren, K., Williams, G.M., Hylden, J.L., Ruda, M.A., Dubner, R., 1992b. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 219, 235-43.
- Ren, K., Dubner, R., 1993. NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. *Neurosci Lett.* 163, 22-6.
- Ritchlin, C., Haas-Smith, S.A., 2001. Expression of interleukin 10 mRNA and protein by synovial fibroblastoid cells. *J Rheumatol.* 28, 698-705.
- Rosery, H., Bergemann, R., Maxison-Bergemann, S., 2005. International variation in resource utilisation and treatment costs for rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Pharmacoeconomics.* 23, 243-57.
- Roth, A., Mollenhauer, J., Wagner, A., Fuhrmann, R., Straub, A., Venbrocks, R.A., Petrow, P., Brauer, R., Schubert, H., Ozegowski, J., Peschel, G., Muller, P.J., Kinne, R.W., 2005. Intra-articular injections of high-molecular-weight hyaluronic acid have biphasic effects on joint inflammation and destruction in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther.* 7, R677-86.
- Saeed, R.W., Varma, S., Peng-Nemeroff, T., Sherry, B., Balakhaneh, D., Huston, J., Tracey, K.J., Al-Abed, Y., Metz, C.N., 2005. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med.* 201, 1113-23.
- Sakurada, T., Wako, K., Sakurada, C., Manome, Y., Tan-no, K., Sakurada, S., Kisara, K., 1996. Spinally-mediated behavioural responses evoked by intrathecal high-dose morphine: possible involvement of substance P in the mouse spinal cord. *Brain Res.* 724, 213-21.
- Sato, J., Suzuki, S., Iseki, T., Kumazawa, T., 1993. Adrenergic excitation of cutaneous nociceptors in chronically inflamed rats. *Neurosci Lett.* 164, 225-8.
- Schäfers, M., Geis, C., Brors, D., Yaksh, T.L., Sommer, C., 2002. Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci.* 22, 536-45.
- Schäfers, M., Geis, C., Svensson, C.I., Luo, Z.D., Sommer, C., 2003a. Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci.* 17, 791-804.
- Schäfers, M., Lee, D.H., Brors, D., Yaksh, T.L., Sorkin, L.S., 2003b. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci.* 23, 3028-38.

- Schäfers, M., Sorkin, L.S., Geis, C., Shubayev, V.I., 2003c. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett.* 347, 179-82.
- Schäfers, M., Svensson, C.I., Sommer, C., Sorkin, L.S., 2003d. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 23, 2517-21.
- Schaible, H.G., Schmidt, R.F., 1985. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol.* 54, 1109-22.
- Schaible, H.G., Grubb, B.D., Neugebauer, V., Oppmann, M., 1991. The Effects of NMDA Antagonists on Neuronal Activity in Cat Spinal Cord Evoked by Acute Inflammation in the Knee Joint. *Eur J Neurosci.* 3, 981-991.
- Schaible, H.G., Grubb, B.D., 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 55, 5-54.
- Schaible, H.G., Ebersberger, A., Von Banchet, G.S., 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 966, 343-54.
- Schaible, H.G., Richter, F., 2004. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 389, 237-43.
- Schaible, H.G., Del Rosso, A., Matucci-Cerinic, M., 2005. Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am.* 31, 77-101, ix.
- Schaible, H.G., 2006. Basic mechanisms of deep somatic tissue. In: McMahon, S.B., Koltzenburg, M. (eds). *Walland Melzack's Textbook of Pain.* Elsevier, London, 621-33.
- Schaible, H.G., 2007. [Pathophysiology of pain]. *Orthopade.* 36, 8, 10-2, 14-6.
- Scheller, M., Bufler, J., Hertle, I., Schneck, H.J., Franke, C., Kochs, E., 1996. Ketamine blocks currents through mammalian nicotinic acetylcholine receptor channels by interaction with both the open and the closed state. *Anesth Analg.* 83, 830-6.
- Schnoebel, R., Wolff, M., Peters, S.C., Brau, M.E., Scholz, A., Hempelmann, G., Olschewski, H., Olschewski, A., 2005. Ketamine impairs excitability in superficial dorsal horn neurones by blocking sodium and voltage-gated potassium currents. *Br J Pharmacol.* 146, 826-33.
- Schott, E., Berge, O.G., Angeby-Moller, K., Hammarstrom, G., Dalsgaard, C.J., Brodin, E., 1994. Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 31, 79-83.

- Schroeder, J.E., Fischbach, P.S., Zheng, D., McCleskey, E.W., 1991. Activation of mu opioid receptors inhibits transient high- and low-threshold Ca^{2+} currents, but spares a sustained current. *Neuron*. 6, 13-20.
- Segond von Banchet, G., Petrow, P.K., Bräuer, R., Schaible, H.G., 2000. Monoarticular antigen-induced arthritis leads to pronounced bilateral upregulation of the expression of neurokinin 1 and bradykinin 2 receptors in dorsal root ganglion neurons of rats. *Arthritis Res.* 2, 424 - 427.
- Seltzer, Z., Cohn, S., Ginzburg, R., Beilin, B., 1991. Modulation of neuropathic pain behavior in rats by spinal disinhibition and NMDA receptor blockade of injury discharge. *Pain*. 45, 69-75.
- Sertüner, F., 1806. Darstellung der reinen Opiumsäure nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neuen Stoff und die dahin gehörigen Bemerkungen. *Trommdorfs J Pharm.* 14, 47 - 93.
- Shaked, G., Czeiger, D., Dukhno, O., Levy, I., Artru, A.A., Shapira, Y., Douvdevani, A., 2004. Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNF α production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. *Resuscitation*. 62, 237-42.
- Sher, G.D., Mitchell, D., 1990. Intrathecal N-methyl-D-aspartate induces hyperexcitability in rat dorsal horn convergent neurones. *Neurosci Lett.* 119, 199-202.
- Sherrington, C.S., 1903. Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol.* 30, 39-46.
- Shubayev, V.I., Myers, R.R., 2000. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res.* 855, 83-9.
- Smith, D.J., Pekoe, G.M., Martin, L.L., Coalgate, B., 1980a. The interaction of ketamine with the opiate receptor. *Life Sci.* 26, 789-95.
- Smith, D.J., Westfall, D.P., Adams, J.D., 1980b. Ketamine interacts with opiate receptors as an agonist. *Anesthesiology*. 53.
- Smith, D.J., Perrotti, J.M., Mansell, A.C., Monroe, P.J., 1989. Ketamine analgesia is not related to an opiate action in the periaqueductal gray region of the rat brain. *Pain*. 21, 253 - 265.
- Smolen, J.S., Steine, G., 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis (review). *Nature Rev Drug Discov.* 2, 473 - 488.
- Snyder, S.H., 1977. Opiate receptors in the brain. *N Engl J Med.* 296, 266-71.
- Sommer, C., Schmidt, C., George, A., 1998. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol.* 151, 138-42.

- Sommer, C., 2001. Cytokines and neuropathic pain, Vol., IASP Press, Seattle, WA.
- Sommer, C., Schäfers, M., Marziniak, M., Toyka, K.V., 2001. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst.* 6, 67-72.
- Sonoda, H., Omote, K., 1996. [Analgesic mechanism of ketamine]. *Masui.* 45, 689-97.
- Stanfa, L.C., Dickenson, A.H., 1993. Cholecystokinin as a factor in the enhanced potency of spinal morphine following carrageenin inflammation. *Br J Pharmacol.* 108, 967-73.
- Stannard, C.F., Porter, G.E., 1993. Ketamine hydrochloride in the treatment of phantom limb pain. *Pain.* 54, 227-30.
- Stein, C., 1994. Interaction of immunecompetent cells and nociceptors, Vol. 2, IASP Press, Seattle.
- Sternberg, E.M., 1997. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest.* 100, 2641-7.
- Stevens, C.W., Yaksh, T.L., 1989. Time course characteristics of tolerance development to continuously infused antinociceptive agents in rat spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther.* 251, 216-23.
- Svensson, C.I., Hua, X.Y., Protter, A.A., Powell, H.C., Yaksh, T.L., 2003. Spinal p38 MAP kinase is necessary for NMDA-induced spinal PGE(2) release and thermal hyperalgesia. *Neuroreport.* 14, 1153-7.
- Tanaka, M., Cummins, T.R., Ishikawa, K., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Waxman, S.G., 1998. SNS Na⁺ channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *Neuroreport.* 9, 967-72.
- Taniguchi, T., Shibata, K., Yamamoto, K., 2001. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats. *Anesthesiology.* 95, 928-32.
- Thompson, S.W., King, A.E., Woolf, C.J., 1990. Activity-Dependent Changes in Rat Ventral Horn Neurons in vitro; Summation of Prolonged Afferent Evoked Postsynaptic Depolarizations Produce a d-2-Amino-5-Phosphonovaleric Acid Sensitive Windup. *Eur J Neurosci.* 2, 638-649.
- ThyagaRajan, S., Madden, K.S., Stevens, S.Y., Felten, D.L., 1999. Effects of L-deprenyl treatment on noradrenergic innervation and immune reactivity in lymphoid organs of young F344 rats. *J Neuroimmunol.* 96, 57-65.
- Tonemori, N., Komatsu, T., Shingu, K., Urabe, N., Seo, N., Mori, K., 1981. Activation of the supraspinal pain inhibition system by ketamine hydrochlorid. *Acta Anaesth Scand.* 25, 355 - 359.

- Torebjork, H.E., Lundberg, L.E., LaMotte, R.H., 1992. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol.* 448, 765-80.
- Tracey, K.J., 2002. The inflammatory reflex. *Nature.* 420, 853-9.
- Tracey, K.J., 2007. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 117, 289-96.
- Trang, L.E., Lorgren, O., Rock-Norlund, A.E., Horn, R.S., Wallace, S.O., 1979. cyclic nukleotides in joint fluid in rheumatoid arthritis and in Reiter's syndrome. *Scand J Rheumatol.* 8, 91 - 96.
- Traynor, J.R., Rance, M.J., 1984. Opiate binding in the rat spinal cord: evidence for mu and delta sites. *Neuropeptides.* 5, 81-4.
- Treede, R.D., Kenshalo, D.R., Gracely, R.H., Jones, A.K., 1999. The cortical representation of pain. *Pain.* 79, 105-11.
- Tung, A.S., Yaksh, T.L., 1981. Analgesic effect of intrathecal ketamine in the rat. *Reg Anaesth Pain Med.* 6, 91 - 94.
- Vogel, C., Lindenlaub, T., Reiges, G., Sommer, C., 2000. Vol., IASP Press, Seattle, WA.
- Vogt, B.A., 2005. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci.* 6, 533-44.
- Waldburger, J.M., Boyle, D.L., Edgar, M., Sorkin, L.S., Levine, Y.A., Pavlov, V.A., Tracey, K., Firestein, G.S., 2008a. Spinal p38 Map kinase regulates peripheral cholinergic outflow. *Arthritis Rheum.* 58, 2919-21.
- Waldburger, J.M., Boyle, D.M., Pavlov, V.A., Tracey, K.J., Firestein, G.S., 2008b. Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the alpha7 nicotinic receptor. *Arthritis Rheum.* 58, 3439-49.
- Walker, J.S., 2003. Anti-inflammatory effects of opioids. *Adv Exp Med Biol.* 521, 148-60.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C.A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J.H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C.J., Tracey, K.J., 2003. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature.* 421, 384-8.
- Wang, Y., Huang, C., Cao, Y., Han, J.S., 2000. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sci.* 67, 261-7.
- Watanabe, C., Sakurada, T., Okuda, K., Sakurada, C., Ando, R., Sakurada, S., 2003. The role of spinal nitric oxide and glutamate in nociceptive behaviour evoked by high-dose intrathecal morphine in rats. *Pain.* 106, 269-83.

- Watkins, J.C., Evans, R.H., 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 21, 165-204.
- Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E., 1995. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci.* 57, 1011-26.
- Watkins, L.R., Maier, S.F., 1999. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7710-3.
- Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., Black, J.A., 1999. Sodium channels and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 7635-9.
- Werz, M.A., MacDonald, R.L., 1983. Opioid peptides selective for mu- and delta-opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing potassium conductance. *Neurosci Lett.* 42, 173-8.
- White, P.F., Way, W.L., Trevor, A.J., 1982. Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology.* 56, 119-36.
- Whiteside, G.T., Adedoyin, A., Leventhal, L., 2008. Predictive validity of animal pain models? A comparison of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for pain drugs in rats and humans. *Neuropharmacology.* 54, 767-75.
- Willis, W.D., 1994. Central plastic responses to pain, Vol., IASP Press, Seattle.
- Willis, W.D., Coggeshall, R.E., 2004. Sensory mechanisms of the spinal cord, Vol., Keumer Academic / Punum Publishers, New York.
- Willis, W.D., Jr., 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res.* 124, 395-421.
- Wong, E.H., Kemp, J.A., 1991. Sites for antagonism on the N-methyl-D-aspartate receptor channel complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 31, 401-25.
- Woolf, C.J., 1981. Intrathecal high dose morphine produces hyperalgesia in the rat. *Brain Res.* 209, 491-5.
- Woolf, C.J., 1983. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature.* 306, 686-8.
- Woolf, C.J., Thompson, S.W., 1991. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain.* 44, 293-9.
- Yaksh, T.L., Rudy, T.A., 1976. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science.* 192, 1357-8.

- Yaksh, T.L., Harty, G.J., Onofrio, B.M., 1986. High dose of spinal morphine produce a nonopiate receptor-mediated hyperesthesia: clinical and theoretic implications. *Anesthesiology*. 64, 590-7.
- Yaksh, T.L., Harty, G.J., 1988. Pharmacology of the allodynia in rats evoked by high dose intrathecal morphine. *J Pharmacol Exp Ther*. 244, 501-7.
- Yaksh, T.L., 1993. The spinal actions of opioids, Vol., Springer, Berlin.
- Yamamoto, T., Yaksh, T.L., 1992. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acid antagonists. *Pain*. 49, 121-8.
- Yu, Y., Zhou, Z., Xu, J., Liu, Z., Wang, Y., 2002. Ketamine reduces NFkappaB activation and TNFalpha production in rat mononuclear cells induced by lipopolysaccharide in vitro. *Ann Clin Lab Sci*. 32, 292-8.
- Zahler, S., Heindl, B., Becker, B.F., 1999. Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand*. 43, 1011-6.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16, 109-10.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin bin ich Herrn Dr. med. Michael Böttger für seine geduldige Beratung, die tolle Zusammenarbeit, die praktische und mentale Unterstützung, sowohl in den Experimenten als auch bei der Durchführung der gesamten Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Unterstützung, für die kritische Diskussion der Daten, sowie für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre

Ganz besonders möchte ich Frau Renate Stöckigt für die exzellente Assistenz bei der Durchführung der Experimente danken.

Bei Frau Gabi Cuny und Konstanze Ernst möchte ich mich für die gewissenhafte Vorbereitung der Utensilien, ihre schnelle Einsatzbereitschaft und technische Unterstützung bedanken.

Außerdem bei Frau Conny Hüttich und Sabine Hitschke für die Aufarbeitung der histologischen Schnitte.

Dem IZKF danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines 12-monatigen Promotionsstipendiums.

Bei meinem guten Freund Sebastian Freitag möchte ich mich für die Hilfe bei der Bewältigung größerer und kleinerer Probleme, die das Word-Dokument mit sich gebracht hat, bedanken.

Zuletzt möchte ich der Liebe meines Lebens Stephan Fischer für die Motivation und geduldige Unterstützung während der Arbeit am Thema danken.

Eigene Veröffentlichung

Boettger, M.K., Weber, K., Gaida, M., Bräuer, R., Schaible, H.G., 2007. Influence of Infliximab and Etanercept on pain-related behaviour during antigen-induced arthritis. *Acta Physiol Scand*. Volume 189, Supplement 653, P21-L2-09.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. med. Micheal Böttger

Frau Hemmelmann (Statistik)

- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 5. März 2009

Konstanze Weber